



**Cássia Cristina da Vera Cruz Junqueira**

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Valorização das águas corticeiras:  
extracção de antioxidantes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia  
Química e Bioquímica

Orientador: João Paulo da Costa de Noronha, Prof. Auxiliar,  
FCT-UNL

Co-orientador: Mestre Rita Lourenço Paiva de Melo, IST/ITN

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Madalena Alves Campos de Sousa  
Dionísio Andrade

Arguente: Professora Doutora Ana Luísa Almada da Cruz Fernando

Vogal: Professor Doutor João Paulo da Costa de Noronha

Mestre Rita Lourenço Paiva de Melo

Professora Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Dezembro 2012**



**Cássia Cristina da Vera Cruz Junqueira**

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Valorização das águas corticeiras:  
extracção de antioxidantes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia  
Química e Bioquímica

Orientador: João Paulo da Costa de Noronha, Prof. Auxiliar,  
FCT-UNL

Co-orientador: Mestre Rita Lourenço Paiva de Melo, IST/ITN

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Madalena Alves Campos de Sousa  
Dionísio Andrade

Arguente: Professora Doutora Ana Luísa Almada da Cruz Fernando

Vogal: Professor João Paulo da Costa de Noronha

Mestre Rita Lourenço Paiva de Melo

Professora Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca



Valorização das águas corticeiras: extracção de antioxidantes.

Copyright© 2012 – Cássia Cristina da Vera Cruz Junqueira – FCT/UNL – UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Todos os excertos e imagens retirados de diversos artigos, presentes ao longo desta dissertação são reproduzidos sob a permissão dos editores originais e sujeitos às restrições de cópia impostos pelos mesmos. À restante dissertação aplica-se a indicação de direitos de autor em nome de Cássia Cristina da Vera Cruz Junqueira, FCT/UNL e UNL.



## **Dedicatória**

Em primeiro lugar, à minha querida mãe, Emília, que com o seu amor, força e dedicação ao longo desses anos logrou o impossível por mim e os meus irmãos, isto é, ser mãe e pai. Sempre deu-me forças ao longo dos anos e sem o seu apoio possivelmente não estaria aqui.

Aos meus queridos irmãos Celsio e Wilma, que sempre cuidaram de mim e que nunca deixaram-me ir a baixo com as aflições da vida.

As minhas lindas sobrinhas (Thais e Thatiane) e sobrinho (Guilherme), que sem os seus sorrisos e brincadeiras para alegrar os meus dias teria sido muito mais complicado. E não posso esquecer o meu cunhado Bruno, que sem o seu grande contributo elas não estariam aqui.

Ao meu pai, que voltou a trazer a alegria ao rosto da minha mãe por estarmos todos juntos. Fiquei feliz de ter tido a oportunidade de te conhecer.





## Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido a inúmeras pessoas que estiveram presentes ao longo da elaboração deste trabalho directa e indirectamente.

De entre todas, destaco as seguintes:

Em primeiro lugar, aos meus orientadores, Professor João Paulo Noronha e Mestre Rita Melo, pela orientação, disponibilidade, partilha de conhecimentos e ensinamentos técnicos transmitidos ao longo da realização deste estudo.

A Professora Isabel Fonseca, que sem a sua ajuda, sugestões e críticas não teria conseguido finalizar este trabalho dentro do prazo.

À Doutora Luísa Botelho por me ter dado a oportunidade de trabalhar com este Grupo fantástico.

À Fabricor, em especial à Engenheira Sónia Ribeiro, por me ter permitido fazer as recolhas e pela simpatia com que me receberam.

À Doutora Maria Helena Casimiro, por me ter facultado um dos reagentes necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de grupo: Chefe, Rita Melo, Telma Silva, Helena Marcos, Sandra Cabo Verde, Marina Oliveira, Joana Madureira, Joana Pereira, Vânia Dores, Inês Nunes, Pedro Santos e Amílcar António, por todo o apoio e simpatia durante o tempo que trabalhei no Instituto Tecnológico e Nuclear.

Não esquecendo, a D. Maria José Carapinha e a D. Maria da Palma Afonso, pelo carinho, simpatia, grande paciência e atenção sempre dispensadas.

Aos meus amigos em especial a Mafalda Izidro pelo apoio e ajuda. E à minha família pelo apoio, amizade e motivação transmitida durante a realização deste trabalho.

A todos Muito Obrigada!



## RESUMO

No processo de transformação da cortiça há uma elevada produção de águas residuais, as águas de cozedura. Estas águas apresentam uma elevada toxicidade e carga orgânica, no entanto são ricas em polissacarídeos e compostos fenólicos (antioxidantes naturais).

O objectivo deste trabalho é estudar e avaliar o conteúdo em compostos fenólicos das águas de cozedura da cortiça, a identificação e a quantificação dos compostos maioritários (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido siríngico e ácido vanílico) e a extracção em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) para possível reaproveitamento destes compostos por parte de outras indústrias (alimentares, farmacêuticas, cosméticas, entre outras). A determinação da quantidade de matéria orgânica presente nas águas de cozedura baseou-se na caracterização físico-química das amostras através da determinação de alguns parâmetros, a Carência Química de Oxigénio (CQO), o Carbono Orgânico Total (COT) e o pH. A determinação da concentração em compostos fenólicos totais foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A avaliação do poder antioxidante foi realizada utilizando dois métodos: captação do radical DPPH<sup>•</sup> e poder redutor férrico (FRAP).

Para efectuar a análise qualitativa e quantitativa dos antioxidantes foi desenvolvido um método cromatográfico de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-DAD (*High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*). Confirmou-se a presença dos quatro compostos maioritários estudados na água de cozedura por GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*).

No processo de extracção em fase sólida utilizaram-se dois tipos de carvões activados (Norit GAC (comercial) e um carvão obtido a partir de caroços de azeitona). Estes carvões foram caracterizados por adsorção de azoto a 77K de modo a obterem-se os parâmetros texturais (área específica, volume poroso e distribuição de tamanho de poros). Para melhorar o processo de extracção, modificou-se a superfície do carvão activado Norit GAC com etilenodiamina (EDA). Usaram-se as técnicas de FTIR e análise elementar, de modo a confirmar a presença da etilenodiamina na superfície do carvão.

Concluiu-se que o melhor carvão activado para a extracção em fase sólida e recuperação dos antioxidantes naturais presentes na água de cozedura da cortiça, foi o carvão activado Norit GAC modificado com EDA.

**Palavras-chave:** Cortiça, Água de cozedura, Antioxidantes, SPE, Carvão Activado



## ABSTRACT

In the transformation process of cork is a high throughput of wastewater, the cork boiling wastewater. These waters have a high of organic weight and toxicity, but are rich in polysaccharides and phenolic compounds (natural antioxidants).

The aim of this work is to study and evaluate the content of phenolic compounds in cork boiling wastewater, identification and quantification of majority compounds (Gallic acid, Protocatechuic acid, Syringic and Vanillic acid) and Solid Phase Extraction (SPE) for possible reuse of these compounds by other industries (food, pharmaceutical, cosmetic, and others). The determination of the quantity of organic matter present in cork boiling wastewater was based on physical-chemical characterization of samples by determining some parameters, the chemical oxygen demand (COD), Total Organic Carbon (TOC) and pH. The determination of the concentration of total phenolic compounds was performed by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu. The evaluation of the antioxidant power was accomplished using two methods: scavenging of the radical DPPH<sup>•</sup> and Ferric Reducing Power (FRAP).

To perform qualitative and quantitative analysis of antioxidants chromatographic method was developed for High Performance Liquid Chromatography- Diode Array Detector (HPLC-DAD). The presence of the four majority compounds studied, in the cork boiling wastewater was confirmed by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS).

In the process of extraction in solid phase it was used two types of activated carbon (Norit GAC (commercial) and a carbon obtained from olive pits). These carbons were characterized by nitrogen adsorption at 77K in order to obtain the textural parameters (specific area, pore volume and pore size distribution). To improve the extraction process, the surface of activated carbon Norit GAC it was modified with ethylenediamine (EDA). It was used FTIR techniques and elemental analysis in order to confirm the presence of ethylenediamine in the surface of the activated carbon.

It was concluded that the best activated carbon for solid phase extraction and recovery of natural antioxidants present in the cork boiling wastewater was activated carbon Norit GAC modified with EDA.

**Keywords:** Cork, Boiling Water, Antioxidants, SPE, Activated Carbon



## Conteúdo

RESUMO .....	IX
ABSTRACT .....	XI
<i>Índice Figuras</i> .....	XVII
<i>Índice de Tabelas</i> .....	XXI
<i>Índice de Símbolos e Abreviaturas</i> .....	XXIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. OBJECTIVOS .....	3
Objectivo geral .....	3
Objectivo específicos .....	3
1.2. ENQUADRAMENTO GERAL .....	4
1.3. INDÚSTRIA DA CORTIÇA .....	5
1.3.1. Estrutura e composição da cortiça .....	7
1.3.2. Fabricor .....	9
1.3.2.1. Água de Cozedura de cortiça .....	9
1.4. ADSORÇÃO .....	13
1.4.1. As forças de interacção envolvidas no processo de adsorção .....	13
1.4.2. Factores que influenciam o processo de adsorção em fase líquida .....	15
1.4.3. Caracterização físico-química do carvão activado .....	15
1.4.3.1. Caracterização Textural .....	16
1.4.3.2. Análise Elementar .....	18
1.4.3.3. Caracterização da química de Superfície ( $pH_{pzc}$ – pH no ponto de carga zero) .....	18
1.4.4. Estudos de Adsorção em soluções aquosas .....	19
1.4.4.1. Modelos cinéticos .....	19
1.4.4.1.1. Modelo cinético de pseudo-primeira ordem .....	20
1.4.4.1.2. Modelo cinético de pseudo-segunda ordem .....	21
1.4.4.2. Isotérmicas de adsorção de equilíbrio .....	22
1.4.4.2.1. Modelo de Langmuir .....	22
1.4.4.2.2. Modelo de Freundlich .....	23
1.4.4.3. Estudo do efeito da Interacção entre os Compostos .....	24

1.5.	ANTIOXIDANTES.....	25
1.5.1.	Compostos Fenólicos .....	25
1.5.2.	Classificação e Mecanismo de acção dos antioxidantes .....	26
1.5.2.1.	Compostos Antioxidantes Naturais vs. Sintéticos .....	28
1.6.	VALORIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	33
1.7.	ESTADO DA ARTE .....	35
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
2.1.	RECOLHA DAS AMOSTRAS .....	39
2.2.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
2.2.1.	Carência Química de Oxigénio .....	39
2.2.2.	Carbono Orgânico Total (COT) .....	40
2.2.3.	Medição do pH .....	41
2.2.4.	Determinação de Compostos Fenólicos Totais (FT).....	41
2.2.5.	Determinação da Actividade Antioxidante.....	42
2.2.5.1.	Método da Captação do radical livre DPPH' .....	42
2.2.5.2.	Método do poder redutor férrico (FRAP) .....	44
2.3.	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	45
2.3.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) .....	45
2.3.2.	Cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS)..	46
2.4.	PREPARAÇÃO DO CARVÃO ACTIVADO NORIT MODIFICADO COM EDA .....	48
2.5.	ADSORVENTE E A SUA CARACTERIZAÇÃO .....	49
2.5.1.	Caracterização Textural por adsorção de N <sub>2</sub> a 77K.....	49
2.5.2.	Análise Elementar .....	49
2.5.3.	Caracterização da química de superfície (pH <sub>pzc</sub> ) .....	50
2.5.4.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	50
2.6.	ADSORVATOS.....	51
2.7.	ESTUDOS DE ADSORÇÃO .....	52
2.7.1.	Cinética de Adsorção .....	52
2.7.2.	Isotérmica de adsorção .....	53
2.7.3.	Adsorção/Dessorção .....	53
2.8.	AJUSTES DOS DADOS EXPERIMENTAIS .....	55



3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
3.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	59
3.1.1.	Recta de Calibração .....	59
3.1.1.1.	CQO.....	59
3.1.1.2.	Método de Colorimetria de Folin-Ciocalteu.....	61
3.1.1.3.	Determinação da actividade antioxidantes.....	62
3.1.1.3.1.	Método da captação do radical DPPH'.....	62
3.1.1.3.2.	Método do poder redutor férrico .....	63
3.1.2.	Resultados Experimentas .....	64
3.2.	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA AMOSTRA.....	66
3.2.1.	HPLC .....	66
3.2.2.	GC-MS.....	67
3.3.	CARACTERIZAÇÃO TEXTURAL: ADSORÇÃO DE AZOTO A 77K .....	72
3.4.	CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR .....	75
3.5.	CARACTERIZAÇÃO DA QUÍMICA DE SUPERFÍCIE ( $pH_{pzc}$ ) .....	75
3.6.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER .....	76
3.7.	TESTES DE ADSORÇÃO .....	78
3.7.1.	Cinética de Adsorção .....	82
3.7.2.	Isotérmica de Adsorção.....	90
3.7.3.	Adsorção/Dessorção .....	92
4.	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....	97
4.1.	CONCLUSÕES .....	99
4.2.	TRABALHO FUTURO .....	102
5.	BIBLIOGRAFIA.....	103
6.	ANEXO .....	111
6.1.	ANEXO A – Protocolo experimental de determinação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	113
6.2.	ANEXO B – Protocolo experimental da Determinação da actividade antioxidante total pelo Método radical livre DPPH .....	115
6.3.	ANEXO C - Protocolo experimental de Determinação do poder antioxidante pelo Método FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) .....	117

6.4.	Anexo D – Espectros dos Compostos estudados .....	121
6.5.	Anexo E – Cromatogramas e espectros analisados neste estudo .....	123

## Índice Figuras

Figura 1.1: Distribuição das empresas corticeiras existentes em Portugal continental em 2001 [3].	5
Figura 1.2: O sobreiro, <i>Quercus suber</i> L. e a extracção da cortiça [7].	6
Figura 1.3: Imagem de SEM de células de cortiça, antes da cozedura [6].	8
Figura 1.4: Imagem de SEM de células da cortiça, depois da cozedura [6].	8
Figura 1.5: Fluxograma da produção das pranchas de cortiça da empresa Fabricor.	9
Figura 1.6: Tanques de cozedura de cortiça da empresa Fabricor [10].	10
Figura 1.7: Estrutura química do ácido gálico.	10
Figura 1.8: Estrutura química do ácido protocatecuico.	11
Figura 1.9: Estrutura química do ácido vanílico.	11
Figura 1.10: Estrutura química do ácido siríngico.	11
Figura 1.11: Estrutura química do ácido ferúlico.	12
Figura 1.12: Estrutura química do ácido elágico.	12
Figura 1.13: Processo de adsorção.	13
Figura 1.14: Classificação da IUPAC para as Isotérmicas de adsorção de gases, $p_i$ , $P_iS$ e $n_i$ são a pressão, pressão de vapor do soluto e a quantidade adsorvida, respectivamente [14].	16
Figura 1.15: Tipos de Histereses [13].	17
Figura 1.16: Estrutura base dos compostos flavonóis ( $R_1$ e $R_2$ – grupo funcional característico de cada flavonóide).	27
Figura 1.17: Estrutura química dos ácidos benzóicos.	27
Figura 1.18: Estrutura química dos ácidos cinâmicos.	28
Figura 1.19: Estrutura química do antioxidante sintético BHA.	30
Figura 1.20: Estrutura química do antioxidante sintético BHT.	30
Figura 1.21: Estrutura química do antioxidante sintético TBHQ.	30
Figura 1.22: Estrutura química do antioxidante sintético THBP.	31
Figura 1.23: Estrutura química do antioxidante sintético PG.	31
Figura 2.1: Reacção de redução do radical livre DPPH $\cdot$ (RH – antioxidante).	42
Figura 2.2: Redução do Complexo férrico-TPTZ em complexo ferroso-TPTZ.	44
Figura 2.3: Esquema ilustrativo de um GC-MS [53].	46
Figura 2.4: Estrutura química do Etilenodiamina.	48
Figura 3.1: $CQO_{teórico}$ em função $CQO_{obtido}$ ( $n=3$ , $\alpha=5\%$ ).	60

Figura 3.2: Recta de calibração em AG para o Método de Folin-Ciocalteu (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	61
Figura 3.3: Recta de calibração para o Método da Captação do radical DPPH $\cdot$ (n=3, $\alpha=5\%$ )...	62
Figura 3.4: Recta de calibração em Sulfato ferroso para o Método FRAP (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	63
Figura 3.5: Cromatograma de água de cozedura concentrada 4 vezes (a 280 nm). ....	66
Figura 3.6: Cromatograma da mistura de soluções dos compostos padrão. ....	68
Figura 3.7: Espectro de massa dos picos com maior concentração na solução da mistura dos padrões (1 – AV, 2 – AP, 3 – AS e 4 – AG). ....	70
Figura 3.8: Cromatograma da amostra de água de cozedura. ....	71
Figura 3.9: Sobreposição dos cromatogramas da amostra com a solução da mistura de soluções dos compostos padrão. ....	71
Figura 3.10: Gráfico da adsorção/dessorção do azoto no CA-1. ....	73
Figura 3.11: Gráfico da adsorção/dessorção do azoto no CA-2. ....	74
Figura 3.12: Espectro de Absorvância FTIR dos três carvões activados (A – absorvância). ....	77
Figura 3.13: Recta de calibração do Ácido Gálico (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	78
Figura 3.14: Recta de calibração do Ácido Protocatecuico (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	79
Figura 3.15: Recta de calibração do Ácido Siríngico (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	79
Figura 3.16: Recta de calibração do Ácido Vanílico (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	80
Figura 3.17: Recta de calibração da Mistura (n=3, $\alpha=5\%$ ). ....	81
Figura 3.18: Comportamento cinético do Ácido Gálico nos carvões activados. ....	82
Figura 3.19: Comportamento cinético do Ácido Protocatecuico nos carvões activados. ....	83
Figura 3.20: Comportamento cinético do Ácido Siríngico nos carvões activados. ....	83
Figura 3.21: Comportamento cinético do Ácido Vanílico nos carvões activados. ....	84
Figura 3.22: Comportamento cinético da mistura de soluções dos compostos padrão no CA-1M. ....	86
Figura 3.23: Comportamento cinético da mistura de soluções dos compostos padrão no CA-1. ....	86
Figura 3.24: Comportamento cinético da mistura de soluções dos compostos padrão no CA-2. ....	87
Figura 3.25: Cromatograma da amostra de água de cozedura de cortiça concentrada a 280 nm. ....	94
Figura 6.1: Espectro do Ácido Gálico. ....	121
Figura 6.2: Espectro do Ácido Protocatecuico. ....	121
Figura 6.3: Espectro do Ácido Siríngico. ....	122

Figura 6.4: Espectro do Ácido Vanílico. ....	122
Figura 6.5: Cromatograma da mistura de soluções dos compostos padrão para os quatro compostos. ....	123
Figura 6.6: Cromatograma da amostra de água de cozedura de cortiça para a gama dos Compostos fenólicos. ....	123
Figura 6.7: Espectro do AV da amostra de água de cozedura. ....	124
Figura 6.8: Espectro do AP da amostra de água de cozedura. ....	124
Figura 6.9: Espectro do AS da amostra de água de cozedura. ....	125
Figura 6.10: Espectro do AG da amostra de água de cozedura. ....	125



## ***Índice de Tabelas***

Tabela 1.1: Área de montado de sobre do Mediterrâneo Ocidental [6].	7
Tabela 1.2: Comparação da adsorção física e química [14].	14
Tabela 1.3: Tabela identificação e caracterização dos Antioxidantes Naturais vs. Sintéticos. ..	32
Tabela 1.4: Compostos fenólicos mais utilizados. ....	33
Tabela 1.5: Preçário dos compostos fenólicos analisados [43]. ....	34
Tabela 2.1: Propriedades químicas dos compostos fenólicos estudados. ....	51
Tabela 3.1: Caracterização da água de cozedura ( $1 \leq n \leq 3$ , M=média das replicas e DP=desvio padrão). ....	64
Tabela 3.2: Concentração dos compostos identificados na amostra de água de cozedura de cortiça (n=3). ....	67
Tabela 3.3: Dados das caracterizações texturais dos carvões activados [16]. ....	72
Tabela 3.4: Análise elementar dos carvões activados. ....	75
Tabela 3.5: Caracterização da química de Superfície dos carvões activados (n=3, M=média das replicas e DP=desvio padrão). ....	75
Tabela 3.6: Parâmetros dos modelos cinéticos das soluções dos compostos padrão isoladas nos respectivos carvões activados. ....	85
Tabela 3.7: Efeito da interacção dos compostos para o estudo cinético. ....	87
Tabela 3.8: Parâmetros dos modelos cinéticos da mistura de soluções dos compostos padrão nos respectivos carvões activados. ....	89
Tabela 3.9: Parâmetros dos modelos isotérmicos das soluções dos compostos padrão isoladas nos respectivos carvões activados. ....	91
Tabela 3.10: Parâmetros dos modelos isotérmicos da mistura de soluções dos compostos padrão nos respectivos carvões activados. ....	91
Tabela 3.11: Quantificação de adsorção e dessorção dos compostos isolados (n=3). ....	92
Tabela 3.12: Percentagem de adsorção e dessorção dos compostos isolados. ....	92
Tabela 3.13: Quantificação de adsorção e dessorção da mistura de soluções dos compostos padrão (n=3). ....	93
Tabela 3.14: Percentagem de adsorção e dessorção da Mistura de Soluções dos compostos padrão. ....	94
Tabela 3.15: Concentração de AG e AP dessorvido da amostra de água de cozedura (n=3, M=média das replicas e DP=desvio padrão). ....	95
Tabela 3.16: Percentagem de dessorção da amostra de água de cozedura. ....	95





## ***Índice de Símbolos e Abreviaturas***

**ARP** – *Antiradical Power* (Capacidade anti-radical)

**BET** – Brunauer, Emmet e Teller

**BHA** – *Buthylated Hydroxyanisole* (2-*terc*-butil-4-hidroxianisole)

**BHT** – *Butylated hydroxytoluene* (hidroxitolueno butilado)

**BJH** – Barret, Joyner e Halenda

**BSTFA** – *N,O-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida*

**CG-MS** – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia gás-líquido – espectrometria de massa)

**COT** – Carbono Orgânico Total

**CQO** – Carência Química de Oxigênio

**DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**FRAP** – *Ferric Reducing Antioxidant Power* (poder antioxidante de redução férrica)

**FTIR** – *Fourier Transform Infrared* (Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier)

**HPLC-DAD** – *High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de Fotodíodos)

**IUPAC** – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

**KHP** – Hidrogenofthalato de potássio

**PG** – *Propyl Gallate* (galato de propilo)

**ROS** – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reactivas de Oxigênio)

**SEM** – *Scanning Electron Microscope* (microscopia eletrônica de varrimento)

**SPE** – *Solid Phase Extraction* (extração em fase sólida)

**TBHQ** – *Tertiary Butylhydroquinone* (*terc*-butil-hidroxiquinona)

**TCA** – 2,4,6-tricloroanisole

**THBP** – 2,4,5-*Trihydroxy-butyrophenone* (2,4,5-tri-hidroxibutilfenona)

**TPTZ** – 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina

# **1. INTRODUÇÃO**



## **1.1. OBJECTIVOS**

### **Objectivo geral**

O presente estudo teve como objectivo geral a caracterização de antioxidantes presentes nas águas efluentes de uma Indústria de rolhas de cortiça e sua quantificação. Aplicação de metodologias de extracção para possível reaproveitamento por parte de outras indústrias.

### **Objectivo específicos**

Os objectivos específicos do estudo foram:

1. Determinar a carência química de oxigénio (CQO), o carbono orgânico total (COT) e o pH da amostra.
2. Determinar a actividade antioxidante, a capacidade antioxidante e os fenólicos totais da amostra.
3. Identificação e Quantificação de antioxidantes presentes na amostra.
4. Estudar a adsorção das soluções dos compostos padrão (isolados e mistura) em solução aquosa em três tipos de carvão activado (Norit Gac, Norit Gac Modificado com EDA e Carvão das Azeitonas).
  - 4.1. Cinética de adsorção;
  - 4.2. Isotérmica de adsorção;
  - 4.3. Capacidade de adsorção e dessorção.
5. Estudar a capacidade de adsorção e dessorção dos três tipos de carvão activado na amostra (água de cozedura da cortiça).

## 1.2. ENQUADRAMENTO GERAL

A União Europeia é líder mundial na produção e transformação de cortiça. Portugal detém 55 % da produção e 85 % da transformação de cortiça a nível mundial, com uma produção média anual de 185.000 Mg. O processo de transformação da cortiça recorre à sua cozedura o que envolve o uso de grandes quantidades de água, havendo consequentemente uma elevada produção de águas residuais. A água de cozedura da cortiça é rica em polifenóis, polissacarídeos, compostos fenólicos e ceras, que permanecem em solução e que contribuem entre outros factores para a acidificação das águas [1].

As águas de cozedura são as mais difíceis de tratar na indústria da cortiça, visto que apresentam uma elevada carga orgânica e considerável toxicidade, rica em substâncias recalcitrantes, ou seja, substâncias difíceis de degradar [2]. Este problema é agravado pelo facto de continuarem a existir muitas unidades industriais de pequena dimensão, com caudais de águas residuais baixos e descontínuos, que são encaminhados para os meios receptores sem qualquer tratamento prévio [1, 3].

Actualmente têm sido propostos vários tipos de processos físicos e químicos (exemplo: extracção com fluídos supercríticos, SPE-OASIS, extracção líquido-líquido, etc.) para o tratamento e extracção de compostos de interesse (antioxidantes) destas águas, mas qualquer uma das abordagens convencionais apresentam fortes desvantagens tais como custos elevados, baixa eficiência de extracção e não são adequados para fazer o scale-up [4].

O processo escolhido para a extracção dos compostos de interesse da água de cozedura, foi a extracção em fase sólida com adsorção por carvão activado, pois este processo não apresenta as desvantagens apontadas acima. Actualmente, o carvão activado é o método mais utilizado no tratamento das águas residuais produzidas neste tipo de indústrias, com o intuito de purificar e tratar estas águas [5].

### 1.3. INDÚSTRIA DA CORTIÇA

A cortiça é uma matéria-prima sustentável, que tem sido utilizada por muitos séculos. Possui qualidades únicas, como por exemplo [6]:

- ✓ É um produto natural;
- ✓ Biodegradável;
- ✓ Grande longevidade;
- ✓ Enorme capacidade de regeneração;
- ✓ Impermeável a líquidos e gases;
- ✓ Muito leve;
- ✓ Excelentes propriedades isolantes (térmica e acústica).

Como a cortiça possui excelentes características é utilizada em vários sectores de actividade, nomeadamente: indústria vinícola, construção civil, indústria automóvel, pesca, entre outros [7,8].

A indústria da cortiça tem constituído um importante papel na economia Portuguesa, porque o nosso país é líder mundial a nível da produção e transformação da cortiça [1].

Em 2001, estavam registadas 841 empresas corticeiras e empregavam mais de 12 mil trabalhadores mas actualmente só estão registadas 597 empresas [3, 6].



**Figura 1.1:** Distribuição das empresas corticeiras existentes em Portugal continental em 2001 [3].

Podemos verificar pela Figura 1.1, que a região Norte apresentava maior número de empresas corticeiras (78%), seguindo-se as regiões de Lisboa e Vale do Tejo (LVT) e Alentejo com 12% e 6%, respectivamente [3].

A cortiça é o revestimento exterior do tronco e ramos do sobreiro (*Quercus suber L.*, ver Figura 1.2), uma árvore espantosa, consegue viver em média 150 a 200 anos, apesar dos muitos descortiçamentos que lhe fazem ao longo da sua existência: cerca de 16, intercalados por períodos de nove anos (em Portugal), dependendo da região de cultura esse período altera [6].



**Figura 1.2:** O sobreiro, *Quercus suber L.* e a extracção da cortiça [7].

*Quercus suber L.* é o nome botânico para um tipo de carvalho de crescimento lento que floresce apenas em regiões específicas do Mediterrâneo Ocidental (Portugal, Espanha, sul da França, parte da Itália, norte da África) e China [7]. Na Tabela 1.1 apresenta-se a distribuição da área de montado na região mediterrânica ocidental.



**Tabela 1.1:** Área de montado de sobreiro do Mediterrâneo Ocidental [6].

País	Área (hectares)	Percentagem
<b>Portugal</b>	715.922	34
<b>Espanha</b>	574.248	27
<b>Marrocos</b>	383.120	18
<b>Argélia</b>	230.000	11
<b>Tunísia</b>	85.771	4
<b>França</b>	65.228	3
<b>Itália</b>	64.800	3
Total	2.119.089	100

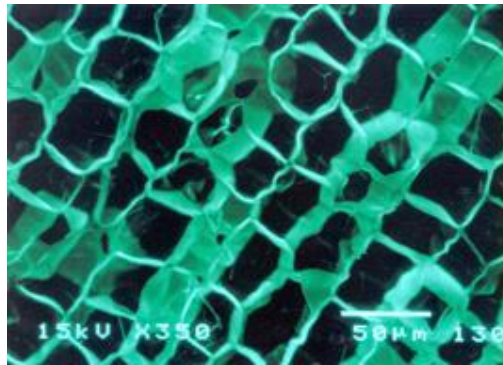
Actualmente, o montado de sobreiro representa um contributo muito importante para a economia e a ecologia de vários países do Mediterrâneo, ocupando uma área mundial de 2.119.089 de hectares. Em Portugal, o sobreiro ocupa uma área de cerca de 716 mil hectares, o que representa cerca de 22,5% da área florestal nacional e cerca de 34% da área mundial. A Europa tem cerca de 60% da área de montado de sobreiro e produz mais de 80% da cortiça do mundo [9].

Esta árvore requer uma grande quantidade de luz solar, uma combinação incomum de baixa precipitação (chuva) e elevada humidade. A qualidade e espessura da casca varia de acordo com as condições específicas de crescimento da árvore (o local da cultura, idade e condições edafoclimáticas) [7].

### **1.3.1. Estrutura e composição da cortiça**

A estrutura microscópica da cortiça é constituída por células que estão agrupadas numa estrutura alveolar característica. Num centímetro cúbico da cortiça contam-se cerca de 40 milhões de células dispostas em fiadas perpendiculares ao tronco de sobreiro [6, 7].

Na imagem de SEM (*Scanning Electron Microscope* – microscopia electrónica de varrimento) antes da cozedura de cortiça, Figura 1.3, podemos observar que as células da cortiça estão comprimidas de forma irregular. Cada célula de cortiça tem a forma de um minúsculo prisma, pentagonal ou hexagonal, cuja altura não ultrapassa os 40 a 50  $\mu\text{m}$  e as células mais pequenas medem entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  [6].



**Figura 1.3:** Imagem de SEM de células de cortiça, antes da cozedura [6].



**Figura 1.4:** Imagem de SEM de células da cortiça, depois da cozedura [6].

Na Imagem de SEM de células da cortiça depois da cozedura, Figura 1.4, observa-se que a estrutura da cortiça torna-se mais regular e o volume aumenta (~20 %), ou seja, a estrutura interna da cortiça é melhorada com o processo de cozedura [6].

De acordo com Gil, L. (2006) [8] a cortiça apresenta a seguinte composição química (valores médios):

1. Suberina (45% - responsável pela compressibilidade e elasticidade);
2. Lenhina (27% - estrutura das paredes celulares);
3. Polissacáridos (12% - também ligados à estrutura da cortiça);
4. Ceróides (6% - repelem a água e contribuem para a impermeabilidade);
5. Taninos (6% - cor e protecção/conservação do material);
6. Cinzas (4%).

A variabilidade dos valores destes componentes, dependem de vários factores como por exemplo: o local da cultura, idade, condições edafoclimáticas e da dimensão da árvore [7].

### 1.3.2. Fabricor

A Fabricor, Indústria Preparação e transformação de cortiça S.A., é uma empresa dinâmica e inovadora, que existe há mais de vinte anos a preparar e transformar a cortiça. A empresa possui uma única fábrica em Alcochete, facturando mais de 12 milhões de Euros no mercado nacional e internacional onde 90% das vendas provém da exportação [10].

A água residual produzida na produção das pranchas de cortiça provém da cozedura (ver Figura 1.5).



**Figura 1.5:** Fluxograma da produção das pranchas de cortiça da empresa Fabricor.

A cozedura é o processo de imersão das pranchas de cortiça em água limpa e a ferver. Os principais objectivos da cozedura consistem em limpar a cortiça, extrair-lhe as substâncias hidrossolúveis, reduzir a microflora, aumentar a espessura, reduzir a densidade e tornar a cortiça mais macia e elástica [6].

#### 1.3.2.1. *Água de Cozedura da cortiça*

A água de cozedura resulta da cozedura das pranchas de cortiça. A água utilizada nestas operações é reutilizada várias vezes até à sua saturação (escurecimento da água), sendo necessário então trocá-la. Esta água contém uma carga elevada de poluentes (2,4,6-tricloroanisol, compostos orgânicos voláteis, taninos e fenóis) que resulta da extracção aquosa a quente das substâncias solúveis em água [10].

Na Fabricor, o processo de cozedura das pranchas é efectuado em dois tanques fechados (ver Figura 1.6), a aproximadamente 96 °C, durante cerca de 1 hora. São realizados 12 ciclos de cozedura alternados pelos dois tanques. A cada dia de produção são processadas 22 Mg de prancha de cortiça, sendo que a mesma água é utilizada durante 3 dias. O consumo de água é aproximadamente de 104 m<sup>3</sup> por cada 3 dias de produção (~640 kg cortiça/m<sup>3</sup> água). Para minimizar a carga orgânica e resíduos sólidos da água de cozedura, esta é submetida a um processo de filtração ao fim de cada ciclo.



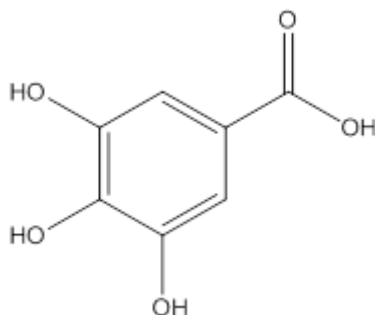
**Figura 1.6:** Tanques de cozedura de cortiça da empresa Fabricor [10].

A empresa introduziu este novo sistema de cozedura com materiais de construção, tratamento e recirculação de águas, não aproveitáveis e automaticamente rejeitadas. Este novo sistema tem como objectivo a eliminação de TCA – 2,4,6-tricloroanisole (contamina o vinho atribuindo-lhe um saber desagradável), compostos orgânicos voláteis, taninos e fenóis para minimizar o impacto destes resíduos no ambiente [10].

As águas de cozedura de cortiça apresentam um aspecto castanho-escuro (quanto mais escura for a água maior é a sua carga orgânica). Estas águas apresentam elevadas concentrações de compostos fenólicos.

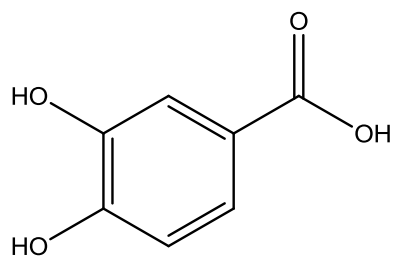
Segundo Minhalma (2001) [11], os compostos fenólicos mais abundantes na água de cozedura de cortiça são:

✓ Ácido gálico



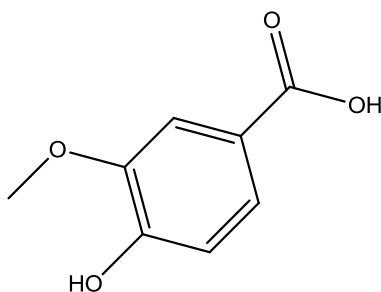
**Figura 1.7:** Estrutura química do ácido gálico.

✓ Ácido protocatecuico



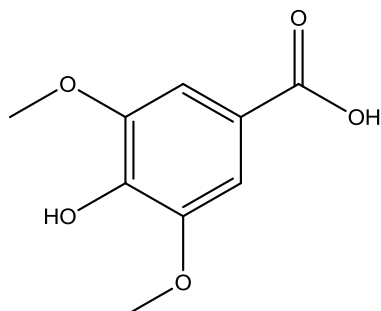
**Figura 1.8:** Estrutura química do ácido protocatecuico.

✓ Ácido vanílico



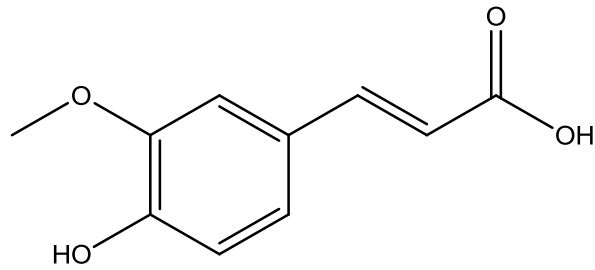
**Figura 1.9:** Estrutura química do ácido vanílico.

✓ Ácido siríngico



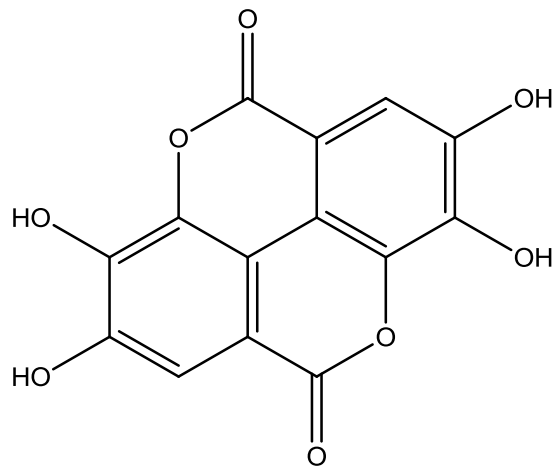
**Figura 1.10:** Estrutura química do ácido siríngico.

✓ Ácido ferúlico



**Figura 1.11:** Estrutura química do ácido ferúlico.

✓ Ácido elágico



**Figura 1.12:** Estrutura química do ácido elágico.

## 1.4. ADSORÇÃO

A adsorção é um processo de transferência de massa de uma fase líquida/gás/vapor para uma fase sólida (adsorvente), na qual se investiga a habilidade de certos sólidos em adsorver na sua superfície determinadas substâncias existentes em soluções líquidas ou gasosas, o que permite separar componentes (importantes) dos demais componentes das soluções, Figura 1.13 [12].

No sistema de adsorção, são chamados adsorvivos os solutos que ainda não estão adsorvidos e são designados adsorvatos os solutos que estão adsorvidos no interior dos poros.

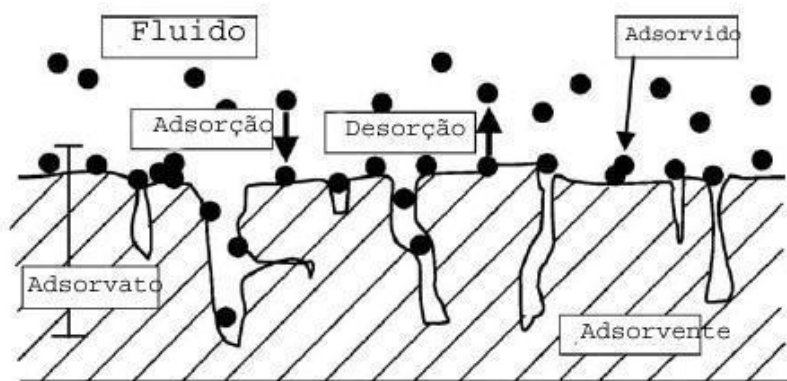


Figura 1.13: Processo de adsorção.

### 1.4.1. As forças de interacção envolvidas no processo de adsorção

A força responsável pela interacção adsorvato-solvente, ou seja, para que ocorra o processo de adsorção no interior da fase é a força atractiva, esta força mantém as várias partes da fase unidas compensando em todas as direcções [13].

As interacções entre as moléculas do líquido e o adsorvente, no processo de adsorção podem ser classificadas em dois tipos [14]:

- **Adsorção física:** as forças envolvidas na adsorção física entre o adsorvato e adsorvente são as forças de Van der Waals. Estas forças são muito fracas, portanto este tipo de adsorção pode ser facilmente revertida por aquecimento ou por diminuição da pressão.

- **Adsorção química:** as forças envolvidas na adsorção química entre adsorvato e adsorvente são as ligações químicas. Esta força é muito forte, portanto, a adsorção não pode ser facilmente revertida.

As interações electrostáticas (adsorvato-adsorvato) ocorrem quando os adsorvidos presentes na fase líquida estão dissociados ou ionizados conforme as condições de operação usadas. Estas interações podem ser atractivas ou repulsivas, dependem do  $pK_a$  dos adsorvidos,  $pH_{pzc}$  do adsorvente e da força iónica da solução [13].

**Tabela 1.2:** Comparação da adsorção física e química [14].

Característica	Adsorção física	Adsorção química
<b>Velocidade de adsorção</b>	Alcança rapidamente o equilíbrio	É um processo mais lento
<b>Temperatura de ocorrência</b>	Baixas	Altas
<b>Especificidade</b>	Baixa, toda a superfície é disponível à adsorção	Elevada, limitada aos sítios específicos do adsorvente
<b>Cobertura da superfície</b>	Adsorção em mono ou multicamadas	Adsorção somente em monocamada
<b>Quantidade adsorvida por unidade de massa</b>	Elevadas	Baixas
<b>Reversibilidade cinética</b>	Reversível	Irreversível
<b>Tipo de ligação (entre adsorvato-adsorvente)</b>	Van der Waals	Ligações químicas



### 1.4.2. Factores que influenciam o processo de adsorção em fase líquida

Segundo Haghseresht *et al.* (2002), os factores que influenciam a capacidade de adsorção são [13, 15]:

- a) **Natureza do adsorvente e do adsorvato:** depende do tipo de força de atracção existente entre o adsorvato e o adsorvente, adsorção química ou física.
- b) **Área de superficial específica do adsorvente:** quanto maior for maior será a capacidade de adsorção;
- c) **Tamanho dos poros do adsorvente;**
- d) **Condições operacionais:** os principais factores que influenciam a adsorção são:
  - Temperatura;
  - Polaridade do adsorvato;
  - Solubilidade: quanto menor for a solubilidade entre o adsorvato e o solvente maior é a capacidade de adsorção;
  - Velocidade da agitação;
  - Concentração inicial do adsorvato;
  - pH da solução: controla as interacções electrostáticas entre o adsorvato e o adsorvente;
  - pK<sub>a</sub> dos adsorvidos: indicativo da dissociação dos adsorvidos;

### 1.4.3. Caracterização físico-química do carvão activado

É fundamental fazer a caracterização físico-química do carvão activado (CA), pois com esta informação pode-se explicar e prever o comportamento dos carvões como adsorventes. Visto que, a capacidade de adsorção dos carvões activados dependem principalmente da área superficial específica, da distribuição dos tamanhos, do volume dos poros e da estrutura química de superfície [5].

Segundo a União International de Química Pura e Aplicada (IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry), os poros podem ser classificados, segundo os seus diâmetros [14]:

- **Microporos:** apresentam maior área superficial, o que proporciona maior capacidade de adsorção para moléculas de menores dimensões, como por exemplo gases e alguns solventes ( $d_i$  - diâmetro dos poros).
  - Primários:  $d_i < 0,8$  nm;
  - Secundários:  $0,8 < d_i < 2$  nm;
- **Mesoporos:** são adequados para adsorção de moléculas de maiores dimensões.
  - $2 < d_i < 50$  nm;

- **Macroporos:** não são muito adequados para a adsorção, visto apresentarem menor área superficial.
  - $d_i > 50 \text{ nm}$ ;

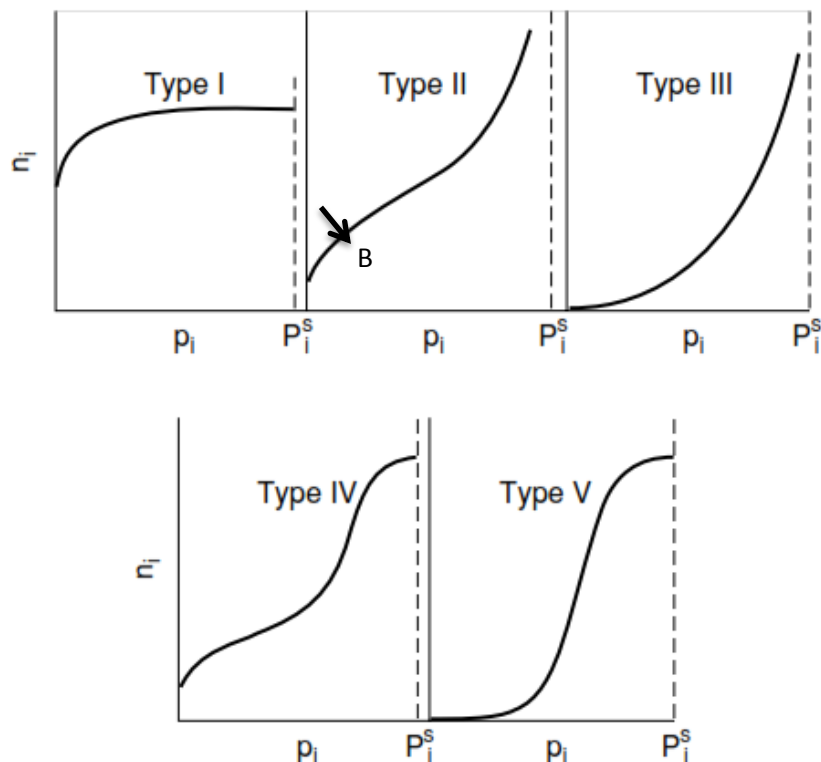
#### 1.4.3.1. Caracterização Textural

A caracterização textural de um carvão activado é importante porque permite determinar a área superficial específica, volume poroso (estreitos ou largos) e o diâmetro de poro, através da análise da isotérmica de adsorção em fase gasosa a temperatura constante [16, 17].

O gás mais usado é o azoto, por ser um gás inerte, uma molécula de pequena dimensão e proporciona resultados com elevado grau de pureza. A adsorção dá-se a temperatura constante (77K) recorrendo a um banho criogénico de azoto líquido [13].

A forma da representação gráfica das isotérmicas também é uma ferramenta experimental para determinar o tipo de interacção entre o adsorvato e o adsorvente.

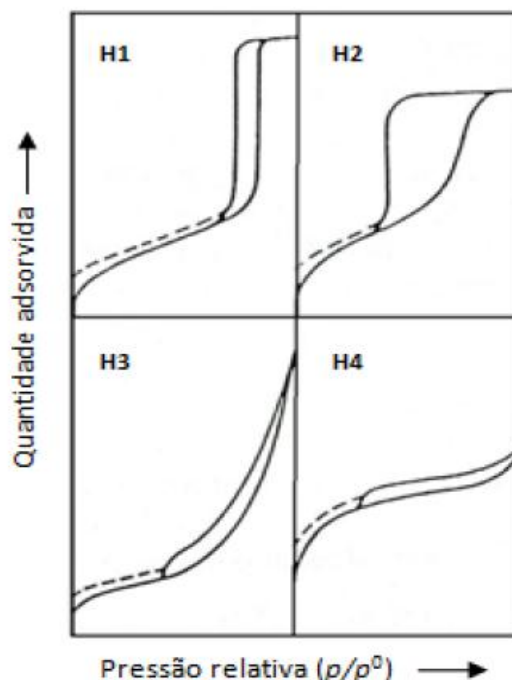
Com base nas recomendações da IUPAC (1985) a maioria das isotérmicas de adsorção física de gases pode ser agrupada dentro de cinco tipos, conforme a Figura 1.14 [13, 14].



**Figura 1.14:** Classificação da IUPAC para as Isotérmicas de adsorção de gases,  $p_i$ ,  $P_i^S$  e  $n_i$  são a pressão, pressão de vapor do soluto e a quantidade adsorvida, respectivamente [14].

- **Tipo I ou Isotérmica de Langmuir:** é côncavo em relação ao eixo da pressão relativa e tende a um valor constante quando a pressão relativa tende para 1. Sólidos microporosos com área superficial relativamente pequena apresentam este tipo de isotérmica. É característico da adsorção química ou física.
- **Tipo II:** este tipo de isotérmica é característica da adsorção física e é adequada para sólidos não-porosos, na qual ocorre adsorção monocamada e multicamada. O ponto B indica o estágio em que a monocamada está completa e inicia-se a adsorção multicamada.
- **Tipo III:** é convexa em relação ao eixo da pressão relativa e não é comum. Trata-se de uma isoterma não favorável.
- **Tipo IV:** tem a parte inicial semelhante à do tipo II e um patamar de adsorção a pressões relativas elevadas. Podem apresentar um ciclo de histerese (Figura 1.15), que é o fenómeno no qual as curvas de adsorção e dessorção não coincidem. Este fenómeno está associado à condensação capilar nos mesoporos, em que há a formação de um menisco côncavo.
- **Tipo V:** é incomum e está relacionada à isoterma Tipo III, pois este caso só ocorre quando as interações entre adsorvato e adsorvente são fracas.

O ciclo de histerese é um fenómeno que está associado com diferentes pressões de saturação durante a condensação do vapor e durante a evaporação do líquido no interior dos poros [13].



**Figura 1.15:** Tipos de Histereses [13].

- **Histerese do tipo H1:** é associado a materiais porosos, em que o poro é de forma cilíndrica aberta nas duas extremidades.
- **Histerese do tipo H2:** é associado ao mecanismo de condensação e evaporação, o poro neste caso tem forma de garrafa e somente o processo de dessorção é vertical.
- **Histerese do tipo H3:** caracteriza-se pelo processo de adsorção e dessorção da isotérmica assintóticos relativamente a vertical  $\frac{P}{P^0} = 1$ . Neste caso o poro apresenta forma plana.
- **Histerese do tipo H4:** processo de adsorção e dessorção das isotérmicas são quase paralelos e horizontais para uma extensa gama de valores na abcissa. Este tipo de histerese está associado a poros estreitos em forma de fenda. O caracter tipo I de isotérmica é indicativo de presença de microporos.

#### **1.4.3.2. Análise Elementar**

A análise elementar é um procedimento químico com o qual se determina o teor de Carbono, Azoto, Hidrogénio e Enxofre presente na amostra de carvão activado analisado [18]. O oxigénio determina-se por diferença.

A amostra é queimada a temperaturas elevadas (~1473,15 K) em fluxo de oxigénio, os compostos de carbono são convertidos em dióxido de carbono, o azoto é reduzido a partir de óxido de azoto por limalhas de cobre, o hidrogénio convertido em vapor de água e o enxofre em óxido de enxofre [13].

#### **1.4.3.3. Caracterização da química de Superfície ( $pH_{pzc}$ – pH no ponto de carga zero)**

O  $pH_{pzc}$  (pH no ponto de carga zero) é definido como o pH no qual a carga superficial do adsorvente é zero. A carga superficial é determinada pelo teor de Carbono, Hidrogénio, Azoto, Enxofre e principalmente do teor de oxigénio. Quando o carvão activado é imerso em água ionizada durante 24 h, desenvolve uma carga superficial que provém da dissociação dos grupos superficiais [13].

Quando o  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  é neutro (7) o pH não depende da massa de carvão activado. Quando o carvão activado apresenta  $\text{pH}_{\text{pzc}} < 7$  são chamados de carvões ácidos mas se o  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  for  $> 7$  são chamados de carvões básicos [13].

A superfície do carvão encontra-se carregada positivamente para valores de pH da solução inferiores ao  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  e negativamente para valores de pH superiores ao  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  [13].

#### **1.4.4. Estudos de Adsorção em soluções aquosas**

Actualmente, a utilização do carvão activado no tratamento de águas residuais é cada vez mais habitual. Mas para o desenvolvimento de um sistema de adsorção, para a remoção de um ou vários adsorvatos, é importante ajustar os dados de adsorção a modelos matemáticos [5].

É fundamental aplicar os modelos matemáticos, pois estes permitem o entendimento das variáveis intervenientes no processo de adsorção.

Os estudos cinéticos de adsorção permitem determinar a velocidade do processo de adsorção. Podendo-se determinar o tempo mínimo de contacto necessário entre o adsorvato e o adsorvente, com o objectivo se obter uma concentração máxima na fase sólida (adsorvente) [20].

Os estudos de adsorção em condições estáticas se complementam com estudos de cinética de adsorção para determinar a resistência à transferência de massa e o coeficiente efectivo da difusão, assim como estudos de adsorção em coluna [21, 25].

Estes estudos permitirão projectar e otimizar equipamentos á escala industrial [21].

A capacidade de adsorção do carvão activado para a remoção de compostos orgânicos está associada a algumas das suas características como: as áreas superficiais, volume poroso, distribuição de tamanho de poros e as propriedades ácido-base da superfície do carvão ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ ) [18].

##### **1.4.4.1. Modelos cinéticos**

O estudo da cinética de adsorção é necessário pelo facto de a maioria dos sólidos utilizados como adsorventes serem porosos e a velocidade de adsorção ser limitada pela facilidade com que as moléculas de adsorvato se difundem para o interior da partícula [22].

O objectivo principal da cinética é o estudo da velocidade do processo de adsorção, e os factores que a influenciam, fornecendo informações sobre de que modo as moléculas interagem umas com as outras. Para tal, é necessário o conhecimento das etapas envolvidas neste processo [13, 22]:

- **Transporte externo:** é o transporte dos solutos da solução até à superfície externa das partículas do carvão activado;
- **Difusão intraparticular:** a partir superfície externa do carvão até aos centros activos de adsorção;
- **Adsorção:** adsorção dos solutos sobre a superfície dos poros internos do carvão, é a etapa mais rápida.

No processo de adsorção, se o equilíbrio for atingido rapidamente, os factores limitantes podem ser uma ou as duas das outras etapas apresentadas [13].

Neste estudo o processo de adsorção foi analisado, utilizando os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

#### 1.4.4.1.1. Modelo cinético de pseudo-primeira ordem

Em 1898, Lagergren [23], propôs o modelo cinético para sistemas de adsorção líquido-sólido baseado na capacidade de adsorção do sólido. A velocidade de remoção do adsorvato com o tempo é directamente proporcional à diferença de concentração de saturação e ao número de centros activos do sólido [24].

A equação cinética de Lagergren é a mais usada para adsorção de um adsorvato de uma solução aquosa. A equação da cinética de pseudo-primeira ordem é dada pela seguinte expressão [23]:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - k_1 \cdot t \quad \text{Equação 1.1}$$

Onde,

- $q_e$  e  $q_t$  – Quantidade adsorvida no equilíbrio e no tempo  $t$  por unidade de massa de adsorvente, respectivamente (mg/g);
- $k_1$  – Constante da velocidade de adsorção da equação cinética de pseudo-primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ).

#### 1.4.4.1.2. Modelo cinético de pseudo-segunda ordem

A velocidade da reacção é dependente da quantidade do soluto adsorvido na superfície do adsorvente e da quantidade adsorvida no equilíbrio. O modelo cinético de pseudo-segunda ordem é dado pela seguinte expressão [24]:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 \cdot (q_e - q_t)^2 \quad \text{Equação 1.2}$$

Onde,

- $q_e$  e  $q_t$  – Quantidade adsorvida no equilíbrio e no tempo  $t$  por unidade de massa de adsorvente, respectivamente (mg/g);
- $k_2$  – Constante da velocidade de adsorção da equação cinética de pseudo-segunda ordem ( $\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

Fazendo a separação das variáveis e integrando nas condições fronteira ( $t=0$ ,  $q_t=0$ ;  $t=t$ ,  $q_t=q_t$ ) na equação 2, fica-se com:

$$q_t = \frac{t}{\frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{t}{q_e}} \quad \text{Equação 1.3}$$

A linearização da equação da cinética de segunda-ordem é dada por:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad \text{Equação 1.4}$$

#### **1.4.4.2. Isotérmicas de adsorção de equilíbrio**

Para o desenvolvimento de um sistema de adsorção de equilíbrio, ou seja, para a remoção de um determinado adsorvato a temperatura constante é importante descrever os dados de equilíbrio através de modelos matemáticos [5].

As isotérmicas de adsorção são realizadas para determinar a capacidade de adsorção do adsorvato pelo adsorvente, o que permite escolher qual o adsorvente mais adequado para a amostra de água de cozedura de cortiça [13].

A quantidade adsorvida habitualmente aumenta com o aumento da concentração de soluto na solução [13].

Os modelos aplicados neste trabalho foram o de Langmuir e de Freundlich os quais são aplicados para sistemas de adsorção com apenas um componente.

##### **1.4.4.2.1. Modelo de Langmuir**

A isotérmica de Langmuir é o modelo mais utilizado para sistemas líquido-sólido, foi desenvolvida assumindo [22]:

- Energias de adsorção são uniformes ao longo da superfície homogénea do adsorvente;
- A afinidade do soluto é igual em todos os sítios de adsorção;
- Não há interação entre as moléculas adsorvidas;
- Ocorre um único mecanismo de adsorção;
- Formação de uma monocamada na superfície livre.

A isotérmica de adsorção de Langmuir é definida a partir da seguinte expressão:

$$q_e = \frac{q_{max} \cdot k_L \cdot C_e}{1 + k_L \cdot C_e} \quad \text{Equação 1.5}$$

Onde,

- $q_e$  – Quantidade adsorvida por unidade de massa de adsorvente (mg/g);
- $C_e$  – Concentração de adsorvato no equilíbrio em solução depois da adsorção (mg/L);
- $q_{max}$  – Capacidade máxima de adsorção (mg/g);
- $k_L$  – Constante de Langmuir (L/mg).



O equilíbrio é atingido quando a velocidade de adsorção do analito na superfície do adsorvente é equivalente à velocidade de dessorção dos mesmos [27]. A constante de Langmuir é uma medida da afinidade do adsorvato com o adsorvente. As constantes  $k_L$  e  $q_{max}$  são determinadas a partir da linearização da equação (1.5).

#### 1.4.4.2.2. Modelo de Freundlich

A isotérmica de Freundlich é uma equação empírica adequada para sistemas não-ideais em superfícies heterogêneas, o que descreve com muita precisão os dados experimentais de adsorção. Isto não implica, a formação de uma monocamada [22]. Apresenta a seguinte forma:

$$q_e = k_F \cdot C_e^{1/n} \quad \text{Equação 1.6}$$

Onde,

- $q_e$  – Quantidade adsorvida por unidade de adsorvente (mg/g);
- $C_e$  – Concentração do adsorvato no equilíbrio (mg/L);
- $k_F$  e  $n$  – Constante de Freundlich [(mg/g).(L/mg)<sup>1/n</sup>] e coeficiente, serão determinados empiricamente.

A constante de Freundlich está relacionada à capacidade de adsorção do adsorvato pelo adsorvente, enquanto  $n$  depende das características da adsorção. Para valores de  $1/n$  muito pequenos, a capacidade de adsorção é independente da  $C_e$ . Se o valor de  $1/n$  for muito elevado, a ligação entre adsorvato e o adsorvente será fraca [13].

#### **1.4.4.3. Estudo do efeito da Interação entre os Compostos**

O efeito da interação entre os componentes de uma mistura pode ser representado pela relação entre a capacidade de adsorção no equilíbrio ( $q_e$ ) do componente em mistura ( $q_{\text{mix},i}$ ) e a capacidade de adsorção no equilíbrio do componente isolado ( $q_{\text{mono},i}$ ) [28].

A partir da relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i}$  (i – composto) pode-se concluir que:

- Quando a relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i} > 1$ , a adsorção de um dos componentes é favorecida pela presença do outro componente;
- Quando a relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i} = 1$ , não existe interação entre as espécies adsorvidas;
- Quando a relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i} < 1$ , a adsorção de um dos componentes é desfavorecida pela presença do outro componente.

## **1.5. ANTIOXIDANTES**

Antioxidantes são compostos aromáticos que contêm, pelo menos, um agrupo hidroxilo. Podem retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, moléculas simples, polímeros e biossistemas, por meio de dois mecanismos [29]:

1. Inibição da formação de radicais-livres (evita a etapa de iniciação da reacção de oxidação).
2. Eliminação de radicais que possibilitam a etapa de propagação, através da doação de átomos de hidrogénio.

Auto-oxidação é um processo lento e radical que acontece por meio de uma reacção em cadeia incluindo as etapas de indução, propagação e terminação. Durante o período de indução, há formação de radicais [30]. Os produtos intermediários, formados pela actividade dos antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático dos compostos fenólicos [31].

Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados funcionam como sequestradores de radicais sendo, portanto, eficazes para prevenir a oxidação dos alimentos. No entanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente à sua toxicidade [33].

### **1.5.1. Compostos Fenólicos**

Segundo Degáspari & Waszczynskyj (2004) [33], compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que abrange uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas. São substâncias que determinam o “sabor”, a coloração e a acção do produto como alimento funcional, notadamente como antioxidantes.

Estes compostos são encontrados na natureza em diversas plantas, disponíveis como: frutas, vegetais em geral e condimentos. As plantas contêm numerosos antioxidantes além dos compostos fenólicos, como por exemplo: compostos azotados, carotenóides, ácido ascórbico e ácido protocatecuico, entre outros. Muitos destes antioxidantes apresentam elevada capacidade antioxidante e estão associados à baixa ocorrência e mortalidade de cancro em seres humanos [34, 36].

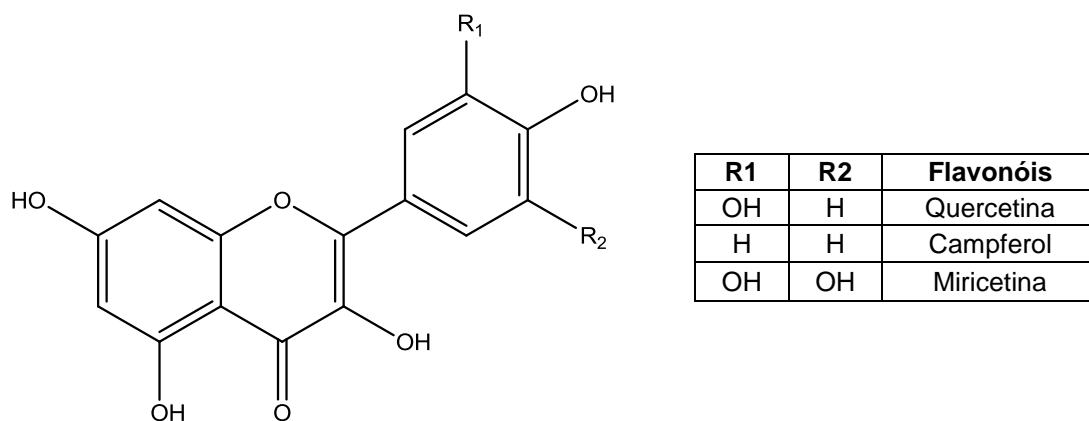
Vários investigadores têm trabalhado na identificação, quantificação, separação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos. Esta dificuldade advém do facto desta complexa família englobar uma vasta gama de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e Lenhinas), possuem elevada polaridade, são sensíveis à acção de enzimas e muito reactivos [36].

### 1.5.2. Classificação e Mecanismo de acção dos antioxidantes

Existem vários critérios de classificação dos antioxidantes descritos na literatura, neste estudo optou-se pela classificação criada por Ribéreau-Gayon, em 1968.

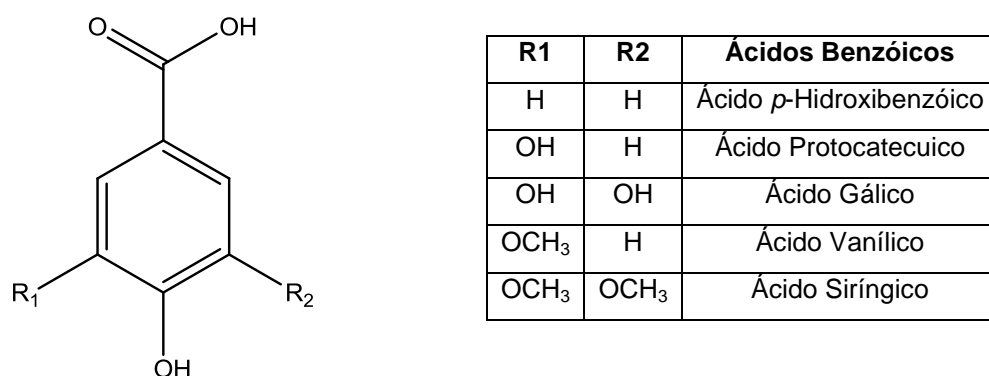
Ribéreau-Gayon classificou os compostos fenólicos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza [37].

- **Pouco distribuídos na natureza:** este grupo engloba os fenóis simples como o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol.
- **Polímeros:** são alguns compostos fenólicos que não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, como por exemplo taninos e as Lenhinas.
  - Taninos: são compostos de elevado peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de contracção, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool polihídrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Os outros são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina, não prontamente hidrolisáveis por tratamento ácido.
  - Lenhinas: são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica, e sua hidrólise alcalina liberta uma grande variedade de derivados dos ácidos benzóicos e cinâmico.
- **Largamente distribuídos na natureza:** são encontrados geralmente em todo o reino vegetal. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas.
  - Flavonóides: possuem uma estrutura base formada por  $C_6-C_3-C_6$ , sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis (Figura 1.16) e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas.



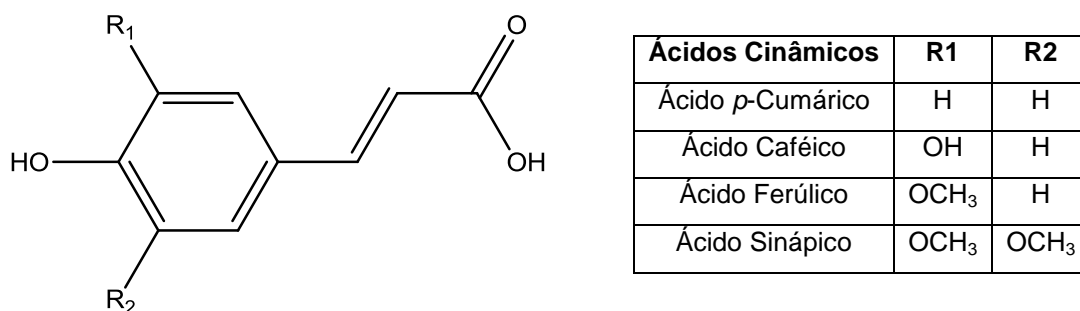
**Figura 1.16:** Estrutura base dos compostos flavonóis ( $R_1$  e  $R_2$  – grupo funcional característico de cada flavonóide).

- Ácidos fenólicos: são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. As suas fórmulas gerais e denominações estão representadas na Figura 1.17.



**Figura 1.17:** Estrutura química dos ácidos benzóicos.

O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono ( $C_6-C_3$ ), sendo quatro os mais habitualmente encontrados no reino vegetal, na Figura 1.18.



**Figura 1.18:** Estrutura química dos ácidos cinâmicos.

Um dos mecanismos de acção dos antioxidantes segue via remoção ou inactivação dos radicais livres formados durante a etapa de iniciação ou propagação da reacção, pela doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas, interrompendo a reacção em cadeia [37].



Onde,

- ROO<sup>•</sup> e R<sup>•</sup> - radicais-livres;
- AH – antioxidantes com um átomo de hidrogénio;
- A<sup>•</sup> - radical inerte.

Um hidrogénio do antioxidante é captado pelos radicais livres com maior facilidade do que os hidrogénios das moléculas insaturadas, formando assim espécies inactivas para a reacção em cadeia e um radical inerte. O radical inerte não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reacções oxidativas [38].

#### 1.5.2.1. **Compostos Antioxidantes Naturais vs. Sintéticos**

Os compostos fenólicos e alguns dos seus derivados são eficazes na prevenção da oxidação de alimentos lipídicos, por aumentarem a vida útil de muitos produtos entre 15% a 200%. No entanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido sobretudo à sua toxicidade [32].

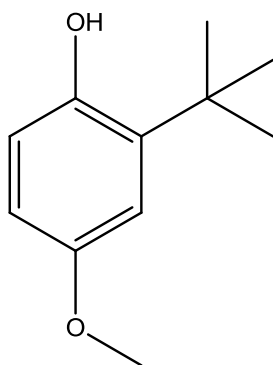
Nos últimos anos, o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) têm alterado a dose diária recomenda (DDR) dos compostos antioxidantes sintéticos dos alimentos como resultado de algumas pesquisas científicas. Verifica-se que uma série de doenças entre as quais cancro, diabetes, artrite, malária, SIDA, doenças cardiovasculares, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigénio extremamente reactivas denominadas de ROS - *Reactive Oxygen Species*. Estas substâncias também estão ligadas a processos responsáveis pelo envelhecimento do organismo [35, 39].

As ROS's são moléculas quimicamente reactivas contendo oxigénio, entre as quais se incluem os radicais livres. Nos organismos vivos as várias formas de ROS's podem ser formadas de diversas maneiras, como por exemplo, nas fontes produtoras de radicais livres, ou seja, o fumo do tabaco, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas [35]. Na selecção dos antioxidantes deve-se ter em consideração os seguintes factores [40]:

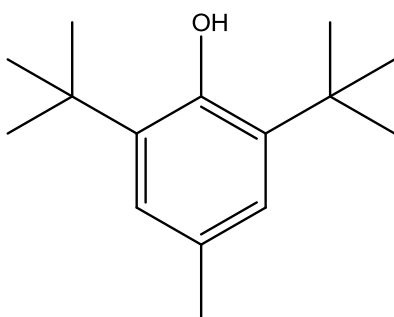
- Devem apresentar elevado e adequado potencial antioxidante nas condições comerciais de armazenamento e manipulação;
- Devem apresentar características de solubilidade compatíveis com os produtos aos quais são agregados;
- Devem ser tecnologicamente vantajosos e economicamente superiores quando comprovados com outros métodos de inibição de oxidação, tais como embalagens a vácuo ou armazenamento ao frio;
- Não devem contribuir com sabores estranhos ou odores indesejáveis aos produtos nos quais são empregados.

Os compostos antioxidantes sintéticos mais utilizados, são: 2-*terc*-butil-4-hidroxianisole (BHA – *Buthylated Hydroxyanisole*), hidroxitolueno butilado (BHT – *Butylated hydroxytoluene*), *terc*-butil-hidroxiquinona (TBHQ – *Tertiary Butylhydroquinone*), 2,4,5-tri-hidroxibutilfenona (THBP – *2,4,5-Trihydroxy-butyrophenone*) e galato de propilo (PG – *Propyl Gallate*) [39].

O BHA e BHT são os antioxidantes sintéticos com melhor eficiência no retardamento da oxidação em gorduras [41].

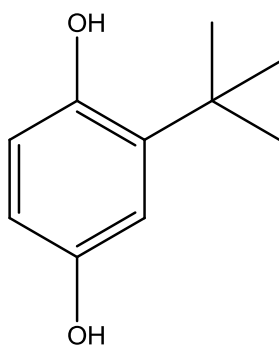


**Figura 1.19:** Estrutura química do antioxidante sintético BHA.



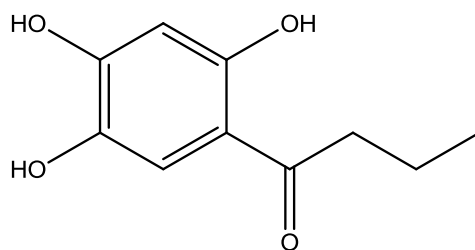
**Figura 1.20:** Estrutura química do antioxidante sintético BHT.

O TBHQ apresenta melhor eficiência no retardamento da oxidação em óleos vegetais (de fritura) por apresentar resistência ao calor [41].



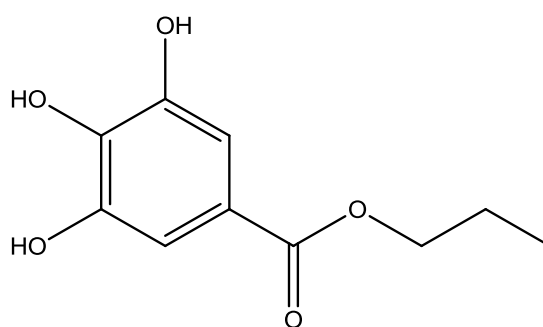
**Figura 1.21:** Estrutura química do antioxidante sintético TBHQ.





**Figura 1.22:** Estrutura química do antioxidante sintético THBP.

O PG é utilizado na conservação de bolachas e produtos de pastelaria.



**Figura 1.23:** Estrutura química do antioxidante sintético PG.

Na Tabela 1.3 apresenta-se de modo resumido alguns resultados de estudos comparativos realizados entre antioxidantes naturais e sintéticos com vista à utilização dos compostos em produtos alimentares [37].

**Tabela 1.3:** Tabela identificação e caracterização dos Antioxidantes Naturais vs. Sintéticos.

Características	Antioxidantes	
	Naturais	Sintéticos
Compostos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ácidos Cinâmicos:</b> ácido caféico, <i>p</i>-cumático e ácido ferúlico, ácido sinápico.</li> <li>• <b>Ácidos Benzoicos:</b> ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido siríngico e ácido vanílico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BHT, BHA, TBHQ e <math>\alpha</math>-tocoferol.</li> </ul>
Actividade Antioxidante em sistemas lipídicos (ordem decrescente)	Ácido caféico> Ácido protocatecuico> Ácido sinápico> Ácido siríngico> Ácido ferúlico> <i>p</i> -cumático> Ácido vanílico	BHT> $\alpha$ -tocoferol> BHA> TBHQ
Distribuídos na natureza	Todos eles encontram-se em abundancia na natureza.	-
Boa eficiência em sistemas lipídicos	Ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido gálico, ácido protocatecuico.	Todos.
Solubilidade neste sistema	Baixa	Boa
Efeitos Maléficos	Não	Sim
Relacionar	Os antioxidantes naturais referidos na actividade antioxidante, apresentam a mesma e em alguns casos maior actividade antioxidante que os sintéticos.	

## 1.6. VALORIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Recentemente têm sido desenvolvidas várias pesquisas envolvendo compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais devido à sua importância na prevenção do desencadeamento das reacções oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal [42].

A aplicação destes compostos com o intuito de aumentar o prazo de validade dos produtos alimentícios é a área da tecnologia de alimentos com maior expansão, tendo em conta os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos [39, 42].

O consumo de antioxidantes sintéticos tem sido restringido devido ao seu potencial risco cancerígeno, deste modo têm-se efectuado pesquisas no sentido de encontrar antioxidantes naturais para substituir os de origem sintética ou efectuar associações entre eles, com o intuito de diminuir a concentração de antioxidantes sintéticos nos alimentos [39].

As oxidações dos produtos podem ser evitadas através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de compostos antioxidantes adequados com propriedades que diminuam ou mesmo impeçam o desencadeamento de reacções oxidativas [37].

A oxidação dos lípidos nos alimentos é responsável pela perda de sabores e formação de compostos químicos indesejáveis que podem ser prejudiciais à saúde [30].

Os compostos fenólicos são largamente utilizados na indústria (e.g.: indústria alimentar, indústria cosmética, entre outros) como antioxidantes. Na Tabela seguinte estão representados os compostos fenólicos mais utilizados [37]. Os compostos benzóicos são os mais abundantes na água de cozedura de cortiça [11].

**Tabela 1.4:** Compostos fenólicos mais utilizados.

<b>Ácidos Cinâmicos</b>	<b>Ácidos Benzóicos</b>
Ácido caféico	Ácido gálico
<i>p</i> -cumático	Ácido vanílico
Ácido ferúlico	Ácido protocatecuico
Ácido sinápico	Ácido Siríngico

Uma das vantagens da extração dos compostos estudados neste trabalho é o preço de venda destes no mercado, como podemos conferir pela Tabela 1.5. O preço destes compostos pode variar entre 30 e 40 €/kg dependendo do vendedor, o antioxidante natural mais caro é ácido gálico e o ácido sirínico o mais barato.

**Tabela 1.5:** Preçário dos compostos fenólicos analisados [43].

<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>Preço (€/kg)</b>
Ácido Gálico (99% pureza)	37,45
Ácido Protocatecuico	35,33
Ácido Sirínico	30,02
Ácido Vanílico	33,98

Existe uma grande procura destes compostos pelas indústrias já mencionadas a cima, para estudos científicos, entre outras aplicações.

## 1.7. ESTADO DA ARTE

Actualmente tem-se desenvolvido muitos estudos com o intuito de purificar as águas residuais de compostos fenólicos tóxicos por extracção em fase sólida [4].

Nestes tipos de estudos os factores que mais influenciam e que podem ser alterados para melhorar o processo são: o tipo de adsorvente, o tamanho (diâmetro das partículas) dos adsorventes, a influência do pH, temperatura, entre outros.

Roostaei et al (2006) [44] e o Lillo-Rodenas et al (2006) [45] observaram que a natureza do adsorvente é um factor relevante, ou seja, afecta directamente a quantidade de soluto que é adsorvida pelo adsorvente. Os estudos verificaram uma variação no processo de adsorção para os diferentes tipos de carvões activados, ou seja, para os adsorventes activados quimicamente o processo de adsorção era mais eficiente, pois, de acordo com os autores, os carvões activados quimicamente possuem um volume maior de microporos.

Roostaei et al (2006) [44] também observaram qual o efeito do tamanho das partículas de adsorvente no processo. Verificaram que diminuindo o tamanho das partículas a adsorção é favorecida, visto que, melhora a difusão das moléculas e o aumento da área de contacto.

Segundo, Dursun et al (2005) [46] o efeito do pH da solução é um factor crucial no processo de adsorção. Os autores observaram que o processo de adsorção é favorecida em casos de  $\text{pH} < 7$ , se a superfície do adsorvente estudado for básica, porque para valores de pH elevados pode ocorrer a dissociação do composto.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**





## 2.1. RECOLHA DAS AMOSTRAS

A recolha das amostras foi efectuada na indústria Fabricor S.A., em dois períodos distintos em Novembro de 2011 e Agosto de 2012. As recolhas foram todas efectuadas num dos tanques de cozedura das pranchas de cortiça no último dia antes da mudança da água, de modo a garantir a maior quantidade de matéria orgânica na amostra.

## 2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

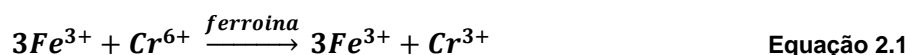
A metodologia usada neste estudo para a determinação da quantidade de matéria orgânica presente nas águas de cozedura de cortiça baseou-se na caracterização físico-química das amostras através da determinação dos parâmetros CQO, COT e pH.

A determinação da concentração em fenólicos totais foi efectuada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A avaliação do poder antioxidante foi realizada utilizando dois métodos: captação do radical DPPH<sup>•</sup> e poder redutor férrico (FRAP).

### 2.2.1. Carência Química de Oxigénio

A carência química de oxigénio (CQO) é definida como a quantidade de um determinado oxidante que reage com a amostra sob condições controladas. A quantidade de oxidante consumido é expressa em equivalentes de oxigénio [47]. Esta medida corresponde a uma estimativa da oxidação da matéria orgânica e/ou inorgânica existente numa amostra líquida [48].

Este método baseia-se na oxidação dos compostos orgânicos por adição de uma solução de dicromato de potássio (solução de digestão), em ebulição, ou seja, a oxidação dos compostos orgânicos resulta na redução de Cr<sup>6+</sup> para Cr<sup>3+</sup>.



Usa-se um catalisador, por exemplo, sulfato de prata porque os compostos alifáticos de cadeia linear são oxidados de forma mais eficiente e provoca a precipitação dos iões halogenetos eliminando assim o erro associado aos compostos inorgânicos.

Em primeiro lugar adiciona-se a um tubo de reacção (Merck) 3,5 mL de uma solução  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{.Ag}_2\text{SO}_4$ , e em seguida 1,5 mL da solução de digestão (0,04 mol/L) e por fim 2,5 mL de amostra. Depois de homogeneizar as soluções no vortex (VWR – Mini Vortexer), tapam-se os tubos e colocam-se no reactor térmico (Thermoreactor TR 300) pré-aquecido a 148°C, durante 3 horas. Após a digestão, o dicromato de potássio reduzido é quantificado por titulação com sulfato de amónio ferroso (FAS) (0,12N), na presença de ferroína [48].

O cálculo da carência química de oxigénio é efectuado com base na seguinte equação:

$$CQO = \frac{(A-B).M.8000}{V_{amostra}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde,

- CQO – carência química de oxigénio (mg  $\text{O}_2$ /L);
- A – volume de FAS usado na amostra branco (mL);
- B – volume de FAS usado na amostra (mL);
- M – massa molecular do FAS;
- 8000 – miliequivalentes em peso de  $\text{O}_2 \cdot 1000$  (mL/L).

O processo de oxidação da amostra pode ser afectado pelo período de digestão, a força de reagente e concentração da amostra [47].

## 2.2.2. Carbono Orgânico Total (COT)

Este método tem como base a conversão do carbono nas moléculas orgânicas e inorgânicas em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), este pode ser quantificado através de um detector de infravermelhos não dispersível (NDIR – *Non-Dispersive Infrared*). O valor do COT é determinado pela diferença entre o Carbono Total (CT) e o Carbono Inorgânico (CI). O CT é determinado pela oxidação de todo o carbono presente na amostra, e o CI é determinado pela conversão do carbono inorgânico da amostra em  $\text{CO}_2$ . Na determinação do CI deve-se acidificar as amostras até a pH=2 para eliminação de possíveis interferências [47, 49].

A determinação do carbono orgânico total neste trabalho é feita no equipamento *IL 550 TOC-TN*, no módulo de líquidos, com um volume de injeção de amostra de 250  $\mu\text{L}$ . Os testes foram realizados em triplicado.

### 2.2.3. Medição do pH

Para a determinação do pH das amostras utiliza-se um medidor de pH (*Radiometer*) equipado com um eléctrodo de pH ligado a um medidor digital.

### 2.2.4. Determinação de Compostos Fenólicos Totais (FT)

Para quantificar os compostos fenólicos totais (FT) presentes na amostra utiliza-se o método de **Colorimetria de Folin-Ciocalteu**.

Este método consiste na redução química do reagente numa mistura de óxidos de tungsténio e molibdenum. Os produtos obtidos na redução de óxidos metálicos têm uma cor azul que exibe uma luz de absorção larga com um comprimento de onda máximo de 765 nm. A quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra é expressa em equivalentes de ácido gálico. A intensidade da luz de absorção do comprimento de onda é proporcional à concentração de fenóis [50, 51].

A evolução da cor é lenta mas pode ser acelerada pelo aquecimento da amostra. Se o aquecimento for excessivo, a perda de cor é bastante rápida e a medição colorimétrica torna-se difícil de reproduzir, por isso não se aplica este passo no procedimento experimental [48]. Como o método depende da reacção cinética e não da conversão estequiométrica, não é muito preciso, podendo ocorrer variações de ~ 5% nas repetições porque estas dependem do controle da temperatura, da precisão do tempo de adição dos reagentes e medições dos espectros [50].

Pode ocorrer uma resposta positiva falsa caso a amostra contenha outras substâncias orgânicas (proteínas, bases de ácidos nucleicos, frutose, aminas, entre outros) e inorgânicas (ferro (II), manganês (II), o nitrito, o cianeto, sulfito, sulfureto, entre outros), que são também capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu [47].

### **Procedimento Experimental**

Colocar 1ml da amostra, 70 mL de água (Milli-Q) e 5 ml de reagente Folin-Ciocalteu em um balão volumétrico de 100ml. Homogeneizar a solução e deixar a incubar durante 5 min à temperatura ambiente. De seguida, adicionar 15 ml de solução de carbonato de sódio (para saber como se preparou as soluções, ver anexo A) e perfazer o volume com água (Milli-Q), homogeneizar e deixar a incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.

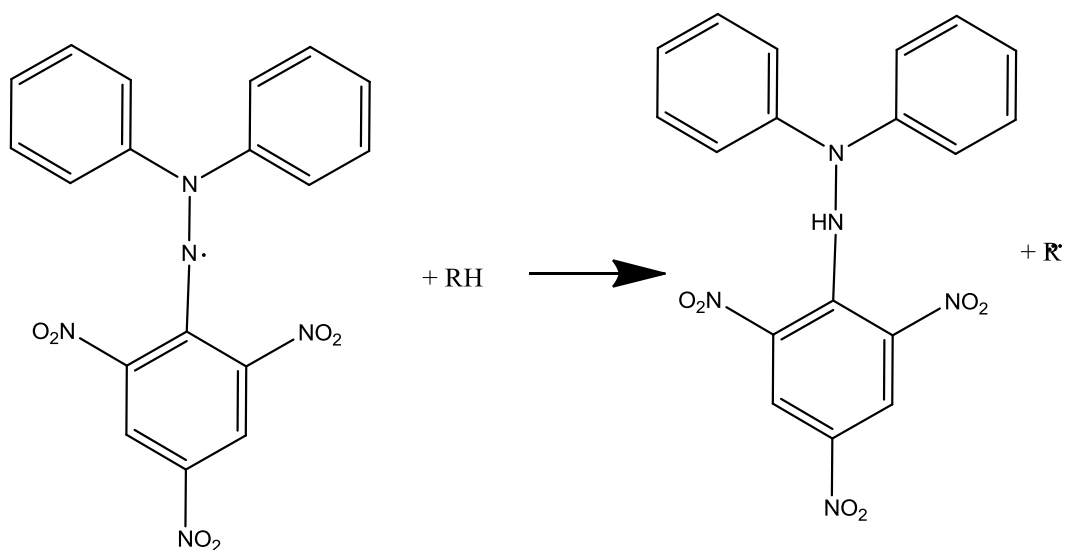
Transferir 1,5 ml para uma célula de vidro e medir a absorvância a 765nm no espectrofotómetro (*Shimadzu UV 1800*) contra o branco (substituição do volume de amostra por água Milli-Q).

### 2.2.5. Determinação da Actividade Antioxidante

A actividade antioxidante é determinada utilizando dois métodos: captação do radical livre DPPH $\cdot$  e poder redutor férrico (FRAP).

#### 2.2.5.1. Método da Captação do radical livre DPPH $\cdot$

O método colorimétrico do radical livre DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), consiste na redução do radical DPPH $\cdot$  à sua forma estável por acção de um composto antioxidante, ou seja, o antioxidante doa um átomo de hidrogénio ao radical tornando-o estável (ver Figura 2.1) [30].



**Figura 2.1:** Reacção de redução do radical livre DPPH $\cdot$  (RH – antioxidante).

A velocidade de redução da reacção química com a adição de DPPH $\cdot$  indica a actividade antioxidante do composto em análise. O radical DPPH $\cdot$  apresenta uma coloração violeta escuro, porém quando neutralizado passa a ter uma coloração amarela. Esta propriedade permite a monitorização visual da reacção, e o número de radicais iniciais podem ser quantificados a partir da alteração na densidade óptica.

A determinação da actividade antioxidante foi efectuada no espectrofotómetro (*Shimadzu UV 1800*) num comprimento de comprimento de onda específico (515nm).

O cálculo da percentagem de DPPH· restante é efectuado com base na seguinte equação:

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot} \text{ restante} = \frac{abs_{amostra}}{abs_{branco}} \times 100 \quad \text{Equação 2.3}$$

Em que,

- $abs_{amostra}$  – Absorvância da amostra;
- $abs_{branco}$  – Absorvância da solução de controlo;

A actividade antioxidante pode ser determinada pela quantidade de substância necessária para inibir 50% da absorvância do radical DPPH (% EC<sub>50</sub>) e pela capacidade anti-radical (ARP). Quanto menor for o EC<sub>50</sub> maior a actividade antioxidante e quanto maior a ARP maior é a eficiência do antioxidante em inibir o radical DPPH· [30].

As vantagens deste método são: o composto é estável, é reprodutível, simples de fazer e económico.

As desvantagens são: a durabilidade da solução de DPPH· (no máximo uma semana), muito volátil e é sensível a luz.

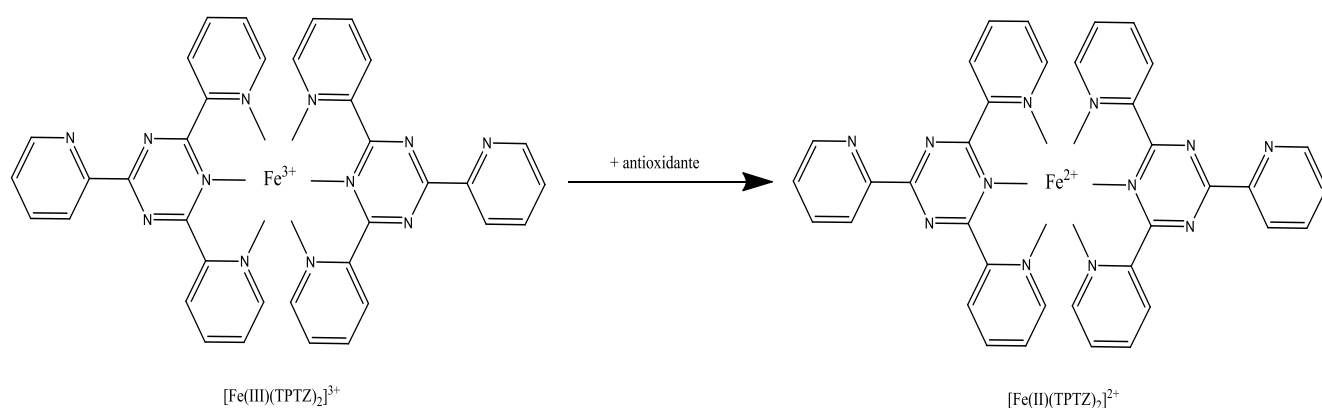
### **Procedimento Experimental**

Pipetar 0,1 mL de cada concentração da amostra (10%; 12,5%; 20% (v/v)) e 3,9 mL do radical DPPH· 0,06 mM (para saber como se preparou as soluções, ver anexo B) para um tubo de reacção (Merck). Homogeneizar os tubos no vortex (VWR – Mini Vortexer). As leituras devem ser monitoradas a cada minuto, durante 90 minutos, para se observar a redução da absorvância até esta estabilizar.

### 2.2.5.2. Método do poder redutor férrico (FRAP)

O método FRAP é simples e automatizado medindo a capacidade de redução do ferro na amostra [52].

Este método mede a capacidade de redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe (III) - TPTZ) em complexo ferroso-tripiridiltiazina (Fe (II) - TPTZ), Figura 2.2, a pH baixo (no caso do compostos fenólicos). Inicialmente o complexo férrico apresenta uma cor azul claro e à medida que o ião é reduzido a cor azul vai ficando mais escura [52].



**Figura 2.2:** Redução do Complexo férrico-TPTZ em complexo ferroso-TPTZ.

Os resultados são medidos no espectrofotômetro (*Shimadzu UV 1800*) a 593nm e quantificados em equivalentes de sulfato ferroso.

As vantagens são: é barato, os reagentes são simples e fáceis de preparar, os resultados são facilmente reproduzíveis e o processo é simples e rápido.

A desvantagem deste método é que a reação é não específica, ou seja, qualquer semi-reação com um potencial redox menos positivo do que a semi-reação  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ irá levar a uma redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ [52].

### Procedimento Experimental

Pipetar 100  $\mu\text{L}$  de amostra e 3 mL da solução de FRAP (para saber como se preparou as soluções, ver anexo C) para um tubo de reação (Merck). Deixar a incubar em banho-maria a 37°C, durante 35 minutos. Ler no espectrofotômetro a 593 nm contra a solução-branco (é preparada da mesma maneira, em vez de usar a solução padrão usar água Milli-Q).

## 2.3. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes na amostra e os resultados dos estudos de adsorção, descritos neste capítulo, são todos determinados pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência.

A confirmação da presença dos compostos fenólicos estudados na amostra de água de cozedura é realizada por Cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa.

### 2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência distingue-se das outras técnicas cromatográficas, visto usar a fase móvel a alta pressão, é uma técnica analítica de separação e quantificação de compostos químicos.

O equipamento de HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Prominence, Shimadzu) é composto por cinco módulos: controlador (CBM-20A), unidade de gradientes de baixa pressão (DGU-20A5), unidade de solventes (LC-20AD), DAD – detector de rede de díodos (SPD-M20A) e forno da coluna (CTO-20AG). O processo de separação ocorre na coluna *LichroCART*® 250-4 (HPLC-cartucho) e Purospher® STAR, RP-18e (5 µm).

Ao injectar uma mistura de compostos na coluna estes são separados mediante a sua afinidade. Os diferentes compostos presentes na mistura passam através da coluna, sendo eluídos com diferentes tempos de retenção, mediante a sua afinidade entre a fase líquida móvel e a fase estacionária.

### Procedimento Experimental

Nas análises cromatográficas, injectar à temperatura ambiente 20 µL das soluções em estudo (soluções dos compostos padrão e amostras), numa coluna. A eluição deve ser efectuada com um sistema binário de solventes (solvente A = ácido fosfórico a 0,5 % e solvente B = acetonitrilo), utilizando um fluxo de fase móvel de 0,6 mL/min. A composição da fase móvel é variada ao longo do tempo, tendo sido programada através do seguinte gradiente: 10% a 15% B (5 min); 15% a 50% B (0,5 min); 50% B (7 min). A detecção foi realizada entre 200 e 400 nm; o tempo máximo de corrida foi de 12,5 minutos, a pressão máxima de 250 bar e a temperatura de 25 °C.

### 2.3.2. Cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS)

O equipamento utilizado para a cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) é descrita com base na Figura 2.3. O equipamento é composto por um orifício de injeção no topo da coluna cromatográfica que está ligado a uma extremidade de uma coluna de metal cheia com material de substrato conectado a um detector. Um gás de arraste impulsiona a amostra para a coluna, é necessário usar um gás inerte para que este não reaja com a amostra ou com a coluna, para conseguir-se obter resultados fiáveis. Por esta razão, os gases de transporte são normalmente o árgon, hélio, hidrogénio, azoto, ou hidrogénio [53].

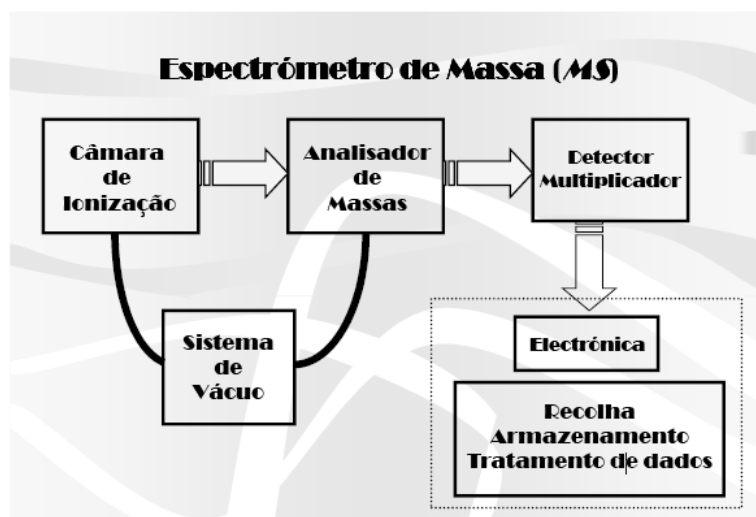


Figura 2.3: Esquema ilustrativo de um GC-MS [53].

A identificação do composto é efectuada por comparação dos espectros da amostra com os espectros apresentados na biblioteca de espectros de massa.

Para facilitar a identificação dos compostos fenólicos (compostos polares) por GC-MS é necessário derivatizar as amostras, pois, esta etapa permite a modificação da funcionalidade da molécula, aumentando a sua volatilidade, diminuindo a polaridade e melhorando a sua estabilidade. Estas novas propriedades podem facilitar o processo de detectabilidade, quantificação, separação, entre outros [54].

O método utilizado de derivatização é a sililação, ocorrendo uma substituição do hidrogénio dos grupos polares (OH) pelo grupo sililo. Essas substituições aumentam significativamente a volatilização da amostra [54].



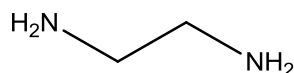
## **Procedimento Experimental**

- **Derivatização:** colocar em *vials* de funco cónico 500 µL de água de cozedura da cortiça e 100 µL de uma mistura com as soluções dos compostos padrão a identificar, depois secar as amostras em linha de azoto. Para remover qualquer presença de água colocar os *vials* no exsicador com vácuo durante 15 minutos. O Reacty-Therm (*Multi-Block Heater* 230 V) deve ser previamente aquecido até 60 °C. Adicionar aos *vials* 50 µL de agente derivatizante (BSTFA – *N,O*-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) e colocar no Reacty-Therm, durante 1 hora.

As amostras foram analisadas no GC (6850 *Network GC System*) conectado a MS (5975C *VLMSD* com Triple-Axis-Detector). O programa do forno: 60°C (3 mins), aquecimento até 350°C. Efectuar as análises recorrendo a coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d<sub>i</sub>; d<sub>f</sub>: 0,25 µm) revestida com 5% fenil-/ 95% dimetilpolissiloxano (DB-50) utilizar hélio como gás de arraste (1 mL/min). Os espectros de massa de impacto electrónico devem ser obtidos a 70 eV utilizando o programa MSD ChemStation E.02.00493 software.

## 2.4. PREPARAÇÃO DO CARVÃO ACTIVADO NORIT MODIFICADO COM EDA

O objectivo deste processo é ligar grupos funcionais específicos do composto etilenodiamina (EDA, ver Figura 2.4) à superfície do carvão activado. O EDA é uma amina básica forte e é muito utilizado na síntese química [55].



**Figura 2.4:** Estrutura química do Etilenodiamina.

O processo de modificação do carvão foi efectuado com o intuito de melhorar a selectividade do carvão activado relativamente aos compostos fenólicos estudados, ou seja, melhorar a eficiência de adsorção e dessorção do carvão activado. Este procedimento baseia-se no trabalho descrito na literatura com algumas modificações [55].

### **Procedimento Experimental**

Colocar 5 mL EDA, 40 mL de metanol num balão de fundo redondo, homogeneizar bem a mistura. De seguida adicionar 5 g de carvão activado Norit Gac (previamente pesado). Colocar o balão em banho-maria no Rotavapor (Büchi Rotavapor R-200; Heating Bath B-490) à 80 °C sob pressão reduzida, durante 1h, no final do tempo retirar o balão do banho-maria e ligar a um take-off acoplado ao vácuo. Depois colocar o balão a aquecer numa manta de aquecimento à 80 °C com resóstato, durante 24h. Lavar o carvão activado modificado com água Milli-Q para remover o excesso de EDA. Para remover o excesso de água utilizar o Rotavapor e de seguida secar o carvão activado modificado na estufa à 50 °C, durante a 4h.

## **2.5. ADSORVENTE E A SUA CARACTERIZAÇÃO**

Os adsorventes escolhidos para a realização dos testes de adsorção do ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido sirínico, ácido vanílico e da mistura de todos os componentes foram:

- Carvão activado Norit Gac (comercial) 1240 Plus (35 a 45 mesh);
- Carvão activado Norit Gac 1240 Plus modificado com EDA;
- Carvão activado Paco – obtido a partir de caroço de azeitonas (70 a 80 mesh).

Estes carvões foram fornecidos pela Norit e pela Universidade de Alicante.

Para as experiências designou-se os carvões da seguinte maneira:

- Carvão activado Norit Gac Comercial (CA-1);
- Carvão activado Norit Gac modificado com Etilenodiamina (CA-1M);
- Carvão activado Paco – obtido a partir de caroço de azeitonas (CA-2).

### **2.5.1. Caracterização Textural por adsorção de N<sub>2</sub> a 77K**

A determinação da área específica de B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller), volume dos poros e a distribuição do tamanho de poros pelo gráfico de BJH (Barret, Joyner e Halenda), dos adsorventes utilizados nas experiências foram analisados no Laboratório de Análises (L211), REQUIMTE (Rede de Química e Tecnologia) da Faculdade de Ciências e Tecnologia.

### **2.5.2. Análise Elementar**

A determinação percentual de carbono, azoto, hidrogénio e enxofre dos adsorventes utilizados nas experiências foram efectuados no Laboratório de Análises (L211), REQUIMTE (Rede de Química e Tecnologia) da Faculdade de Ciências e Tecnologia.

### 2.5.3. Caracterização da química de superfície ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ )

A determinação do ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ ) foi realizada por titulação mássica dos diferentes tipos de carvões activados.

#### **Procedimento Experimental**

Colocar 1 g de carvão activado num frasco fechado com 10 ml de água desionizada, a agitar durante 24h num agitador orbital a 115 rpm à temperatura ambiente. Este teste desse ser feito em triplicado para cada carvão activado.

### 2.5.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas com o objectivo de identificar os principais grupos de ligações químicas presentes na superfície dos carvões activados estudados.

Os espectros foram elaborados na região do infravermelho ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) operando em modo automático e o número de scans por espectro foram 24. A relação para a preparação de cada pastilha de KBr foi de 0,5 mg CA por 200 mg de KBr, utilizando FTIR *system Spectrum BX - Perkin Elmer* (DQ-FCT-UNL, Caparica, Portugal).

## 2.6. ADSORVATOS

Nos testes de adsorção utilizou-se os seguintes compostos padrão como adsorvatos: Ácido Gálico (Sigma® Chemical Company), Ácido Siríngico (Sigma® Chemical Company), Ácido Vanílico (Fluka® Analytical) e Ácido Protocatecuico (Aldrich® Chemistry).

A Tabela 2.1 apresenta as principais propriedades químicas dos compostos fenólicos estudados.

**Tabela 2.1:** Propriedades químicas dos compostos fenólicos estudados.

<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Nome CAS número</b>	<b>Nome IUPAC</b>	<b>Neutro Ácido Básico</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>pK<sub>a</sub></b>	<b>PM (g/mol)</b>	<b>λ<sub>max</sub> (nm)</b>
C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Ácido Gálico 149-91-7	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico	Ácido	110 g/L em água a 20 °C	4,4	170,12	272
C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Ácido protocatecuico 99-50-3	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	Ácido	29,4 g/L em água a 25 °C	4,5	154,12	260 295
C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Ácido Vanílico 121-34-5	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	Ácido	10 g/L em água a 20 °C	4,3	168,04	261 292
C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Ácido Siríngico 530-57-4	Ácido 4-hidroxi 3,5-dimetoxibenzoico	Básico	5,78 g/L em água a 20 °C	7,4	198,05	275

## 2.7. ESTUDOS DE ADSORÇÃO

As análises foram conduzidas em frascos de 10 mL (Merck), através da adição de um volume conhecido de adsorvato em uma determinada quantidade de massa de adsorvente (estas quantidades dependem dos testes). Em seguida os frascos foram fechados, fixados em suportes, colocados em banho-maria a 25 °C e agitados a 170 rpm (agitação linear por minuto).

Nos testes descritos abaixo deve-se alterar o pH natural das soluções para 4,6 (também para a recta de calibração), para ter-se as mesmas condições que a amostra de água de cozedura. Se, o pH das soluções for superior a 4,6 usa-se ácido clorídrico (1M) mas se for inferior a 4,6 deve-se usar hidróxido de sódio (1M).

No final de cada teste, cada frasco é retirado do banho-maria e o seu conteúdo filtrado por filtro de membrana (acrodisc 0,45 µm). O filtrado foi analisado por HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (Prominence, Shimadzu).

Estes testes foram realizados para cada carvão, para cada composto padrão e para a mistura de todos os compostos (os testes foram realizados em triplicado).

### 2.7.1. Cinética de Adsorção

Realiza-se este teste para se determinar qual o tempo de contacto necessário para que se atinja o patamar de equilíbrio. A quantificação da concentração adsorvida no final de cada tempo é determinada a partir da recta de calibração (se a amostra for diluída tem-se de ter em conta o factor de diluição).

#### **Procedimento Experimental**

Colocar 250 mg de carvão activado e 25 mL de solução (500 mg/L) num Kitasato. De seguida colocar os Kitasato para agitar em banho-maria a 25 °C, e retirar 30 µL de solução em intervalos de 5min nos primeiros 15 min, de seguida de 15 em 15 min até fazer 1 hora, depois fazer de 30 em 30 min durante 1 hora e depois fazer 1 em 1 hora até atingir o equilíbrio.

### 2.7.2. Isotérmica de adsorção

Neste teste determina-se qual a quantidade de composto fenólico adsorvida por massa de carvão activado no equilíbrio  $\left(q_e - \frac{\text{mg de adsorvato}}{\text{g de adsorvente}}\right)$ , para cada composto fenólico e mistura nos carvões activados estudados neste trabalho. A  $q_e$  é calculada a partir da seguinte equação:

$$q_e = \frac{(C_e - C_0)V}{m_{CA}} \quad \text{Equação 2.4}$$

Em que,

- $C_e$  – Concentração de adsorvato no equilíbrio (mg/L);
- $C_0$  – Concentração inicial de adsorvato (mg/L);
- $V$  – Volume da solução (2 mL);
- $m_{CA}$  – Massa de carvão activado (10 mg).

### Procedimento Experimental

Colocar 10 mg de carvão activado e 2 mL de solução num frasco, repetir este passo para as cinco concentrações (350, 375, 400, 440 e 475 mg/L).

Colocar a suspensão para agitar durante 1,5 horas em banho-maria a 25°C, para assegurar que o equilíbrio de adsorção é atingido (este tempo deve ser confirmado antes com o teste cinético).

### 2.7.3. Adsorção/Dessorção

O objectivo deste teste é determinar qual dos carvões activados estudados é o melhor para o processo de adsorção e dessorção.

### **Procedimento Experimental**

- **Adsorção**

Colocar 10 mg de carvão activado num frasco. Depois adicionar 2 mL das soluções dos compostos padrão ou da mistura aos frascos e agitar a suspensão durante 1 hora.

- **Dessorção**

Adicionar 4 mL de acetonitrilo ao frasco. Depois colocar no banho de ultrasons, durante 20 min, e recolher a solução sobrenatante.



## 2.8. AJUSTES DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os valores dos parâmetros para as cinéticas e para as isotérmicas de adsorção foram determinados no programa Excel<sup>®</sup>. Através das equações descritas no Capítulo 1.4, para os respectivos modelos de adsorção, determina-se o valor da quantidade adsorvida calculado ( $q_{calc}$ ) para cada instante.

Ajusta-se os valores calculados aos experimentais, manipulando-se os parâmetros de maneira a que os pontos calculados se aproximem o mais possível aos pontos experimentais. Este ajuste funciona como estimativa inicial para aplicar a ferramenta SOLVER. Esta ferramenta irá ajustar os valores calculados aos experimentais minimizando a Soma de Quadrado de Erros (SQE) (Equação 2.5). A validade dos modelos é verificada pela SQE.

$$SQE = \sum_{i=1}^x (q_{i,exp} - q_{i,cal})^2 \quad \text{Equação 2.5}$$

Em que,

- $q$  – Quantidade adsorvida para cada instante por unidade de massa de adsorvente (mg/g);
- $x$  – Número de pontos experimentais.



### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no trabalho através da metodologia descrita no capítulo 2.

### **3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE**

A análise da amostra não deve ser feita depois de 3 a 4 dias da recolha e deve ser guardada no frigorífico a 4 °C, para não haver degradação da amostra [11].

Para se conseguir determinar os resultados para amostra, deve-se antes elaborar as rectas de calibração para os métodos descritos no capítulo 2.2, não se determinou para o COT, pH e DPPH.

#### **3.1.1. Recta de Calibração**

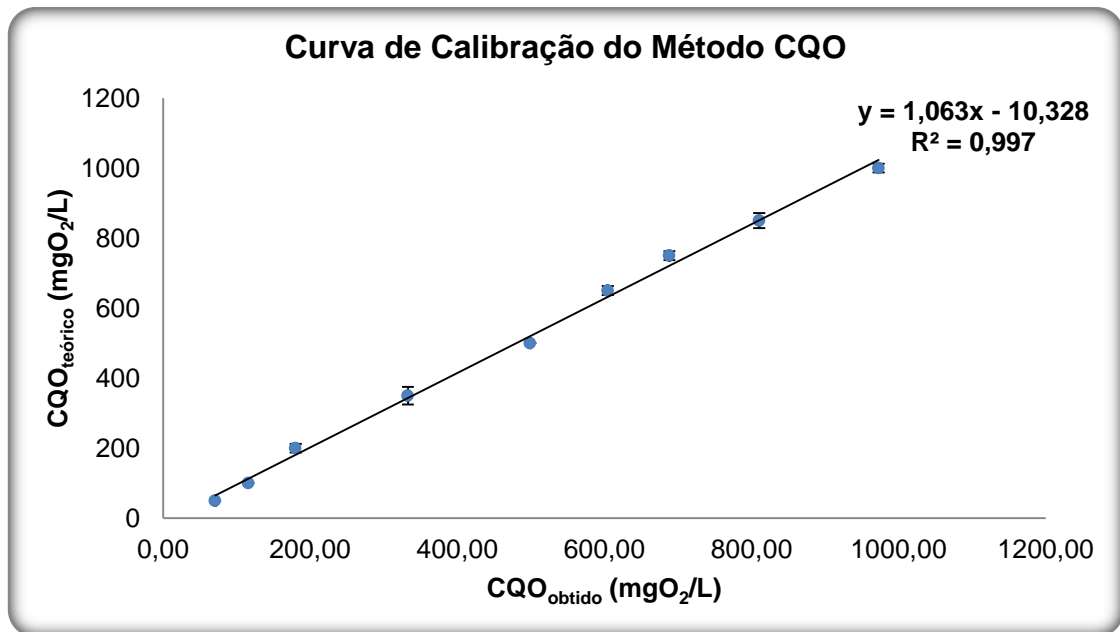
##### **3.1.1.1. CQO**

Neste método efectua-se a recta de calibração para minimizar os possíveis erros na determinação da CQO, por causa da oxidação dos compostos inorgânicos que possam estar presentes na amostra e nas soluções padrão.

O protocolo experimental foi idêntico ao descrito no capítulo 2.2.1., a única mudança é a utilização da solução padrão de hidrogenofthalato de potássio (KHP), como amostra, a várias concentrações com CQO conhecidos (50, 100, 200, 350, 500, 650, 750, 850 e 1000 mgO<sub>2</sub>/L). Preparou-se uma única solução-mãe, a de maior concentração (1000 mgO<sub>2</sub>/L, KHP<sup>1</sup> = 0,8503 g) e depois efectuou-se as diluições necessárias para obter-se as outras concentrações.

---

<sup>1</sup> Esta é a quantidade que se colocar num balão de 1 L, o KHP deve ser previamente seco à 105 °C.



**Figura 3.1:** CQO<sub>teórico</sub> em função CQO<sub>obtido</sub> (n=3, α=5%).

Na Figura 3.1 podemos observar que existe linearidade entre as duas variáveis, com valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,997. Com a seguinte equação podemos determinar o CQO corrigido, é:

$$y = 1,063x - 10,328$$

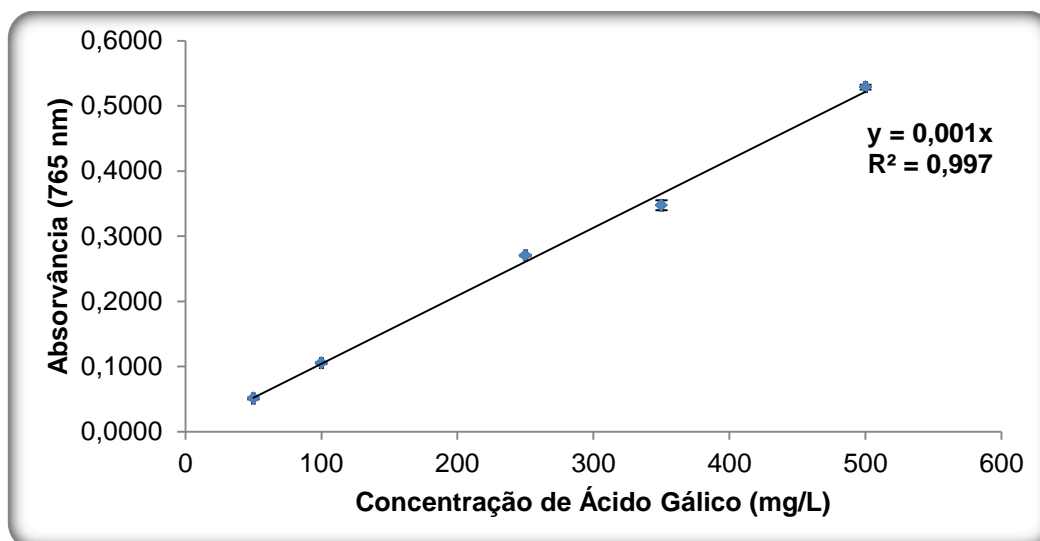
**Equação 3.1**

Em que,

- $x$  – Valor de CQO obtido experimentalmente;
- $y$  – Valor de CQO corrigido.

### 3.1.1.2. Método de Colorimetria de Folin-Ciocalteu

Os testes para a quantificação do conteúdo em compostos fenólicos foram realizados por espectrofotometria UV/Visível. Através da construção de recta de calibração utilizando o ácido gálico (AG) como solução padrão, a várias concentrações conhecidas (50, 100, 250, 350 e 500 mg AG/L).



**Figura 3.2:** Recta de calibração em AG para o Método de Folin-Ciocalteu (n=3,  $\alpha=5\%$ ).

A equação 3.2 é a equação da recta de calibração obtida para o método de Folin-Ciocalteu, esta é utilizada para determinar a concentração de fenóis totais em equivalentes de Ácido Gálico (EAG).

$$y = 0,0010x$$

**Equação 3.2**

Em que,

- $x$  – Concentração de ácido gálico (mg/L);
- $y$  – Absorvância é lida no comprimento de onda 765 nm.

### 3.1.1.3. Determinação da actividade antioxidantes

#### 3.1.1.3.1. Método da captação do radical DPPH<sup>•</sup>

Os testes para a determinação da actividade antioxidante são realizados por espectrofotometria UV/Visível no comprimento de onda 515 nm. Calcula-se a percentagem de DPPH<sup>•</sup> restante (ver equação 2.3) para as diferentes percentagens volumétricas da amostra (água de cozedura de cortiça).

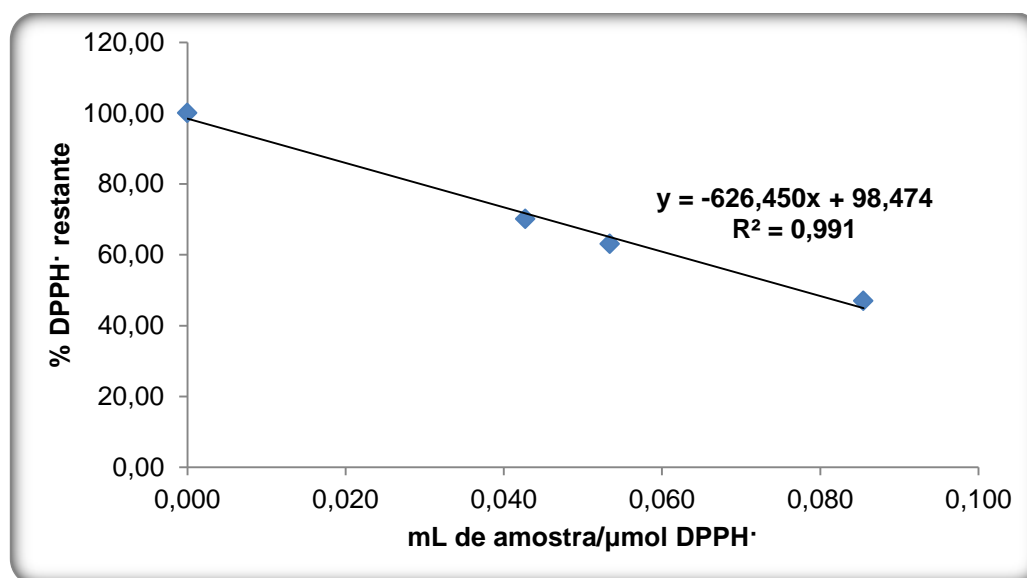


Figura 3.3: Recta de calibração para o Método da Captação do radical DPPH<sup>•</sup> (n=3, α=5%).

Determina-se o valor de EC<sub>50</sub> através da equação da recta de calibração (ver Figura 3.3) para amostra estudada. É calculado a partir da seguinte equação:

$$y = -626,450x + 98,474 \quad \text{Equação 3.3}$$

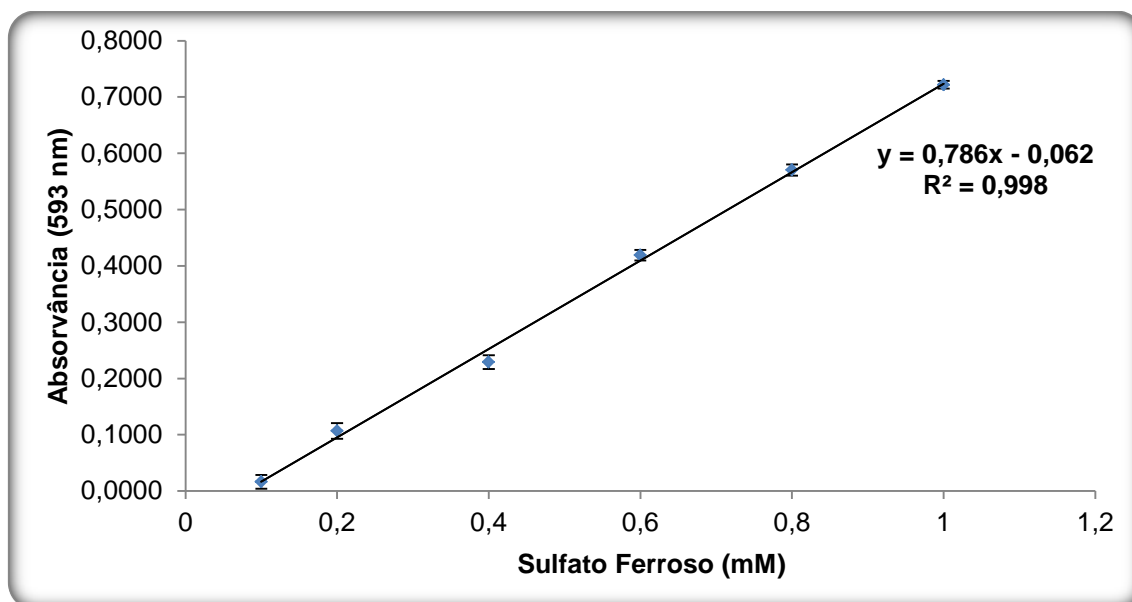
Em que,

- $y$  – Concentração efectiva para inibir 50% do radical DPPH<sup>•</sup>;
- $x$  – Volume de amostra por micromole do radical DPPH<sup>•</sup> (mL de amostra/μmol DPPH<sup>•</sup>).



### 3.1.1.3.2. Método do poder redutor férrico

Os testes para a determinação da actividade antioxidante para o método FRAP são realizados por espectrofotometria UV/Visível. Através da construção de recta de calibração utilizando o Sulfato ferroso como padrão em várias concentrações conhecidas (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mM).



**Figura 3.4:** Recta de calibração em Sulfato ferroso para o Método FRAP (n=3,  $\alpha=5\%$ ).

Determina-se a actividade antioxidante em equivalentes de sulfato ferroso (ESF mM), através da equação da recta de calibração (ver Figura 3.4) para amostra estudada. É calculado a partir da seguinte equação:

$$y = 0,786x - 0,062 \quad \text{Equação 3.4}$$

Em que,

- $x$  – Concentração de sulfato ferroso (mM);
- $y$  – Absorvância é lida no comprimento de onda 593 nm.

### 3.1.2. Resultados Experimentais

Na tabela 3.1 estão apresentados os valores obtidos no presente estudo e os descritos na literatura para os parâmetros de caracterização da água de cozedura de cortiça da empresa **Fabricor S.A.**.

**Tabela 3.1:** Caracterização da água de cozedura ( $1 \leq n \leq 3$ , M=média das replicas e DP=desvio padrão).

Parâmetros	Valores obtidos (M $\pm$ DP)	Valores da Literatura
CQO (mg O <sub>2</sub> /L)	3656 $\pm$ 194	2285 - 2604 <sup>1</sup>
COT (mg C/L)	1430 $\pm$ 4,7	671 - 1057 <sup>1</sup>
pH	5	5 <sup>2</sup>
FT (mg EAG/L)	779 $\pm$ 31	499 - 614 <sup>2</sup>
EC <sub>50</sub> (mL de amostra/ $\mu$ mol DPPH $\cdot$ )	0,08	-
EC <sub>50</sub> (mL de amostra)	0,02	-
ARP	13	-
FRAP (mmol ESF/L)	15 $\pm$ 0,7	-

A partir das seguintes referências: <sup>1</sup> [56] <sup>2</sup> [57].

Como se pode observar pela Tabela 3.1, os valores de CQO e COT são superiores aos resultados descritos na literatura. Isto pode ocorrer devido a diversos factores, como por exemplo: ao lote de cortiça usado e à quantidade de paletes de cortiça que foram processados até a altura da recolha das amostras. A quantidade de pranchas processadas na água de cozedura das amostras analisadas neste estudo e as descritas na literatura, foram 62 Mg de paletes e de 20 – 22 Mg de paletes, respectivamente.

Os valores de FT (compostos fenólicos totais) e pH são próximos dos resultados descritos na literatura. Relacionando os valores de FT e pH obtidos neste estudo com os descritos na literatura, observa-se que o valor de pH é maior do que o esperado, visto que, quanto mais rica for a amostra em ácidos fenólicos menor deveria ser o pH.

Como a amostra estudada continha elevada quantidade de pranchas processadas do que os descritos na literatura, seria de esperar que os valores dos parâmetros analisados acima fossem pelo menos duas vezes superiores aos obtidos, isto pode estar relacionado com o facto de que a água de cozedura produzida na Fabricor ser filtrada entre cada ciclo de cozedura, então pode assumir-se que a maior parte dos compostos fenólicos ficam retidos nas lamas.

Os valores da actividade antioxidante obtidos, por dois métodos distintos, o método da captação do radical DPPH $\cdot$  e o método do poder redutor férrico (FRAP) apontam para que a água de cozedura de cortiça da **Fabricor S.A.** tem uma elevada actividade antioxidante.

O ARP do ácido gálico [30] é de 12,5 e sendo este composto conhecido pelo seu elevado poder antioxidante, então o valor de 13 obtido apontará igualmente para uma actividade antioxidante elevada.

Verifica-se ser necessário 0,0774 mL de água de cozedura para se conseguir inibir metade de 1  $\mu$ mol de DPPH $\cdot$ . Quanto mais baixo for o valor de EC<sub>50</sub>, maior é o seu poder antioxidante.

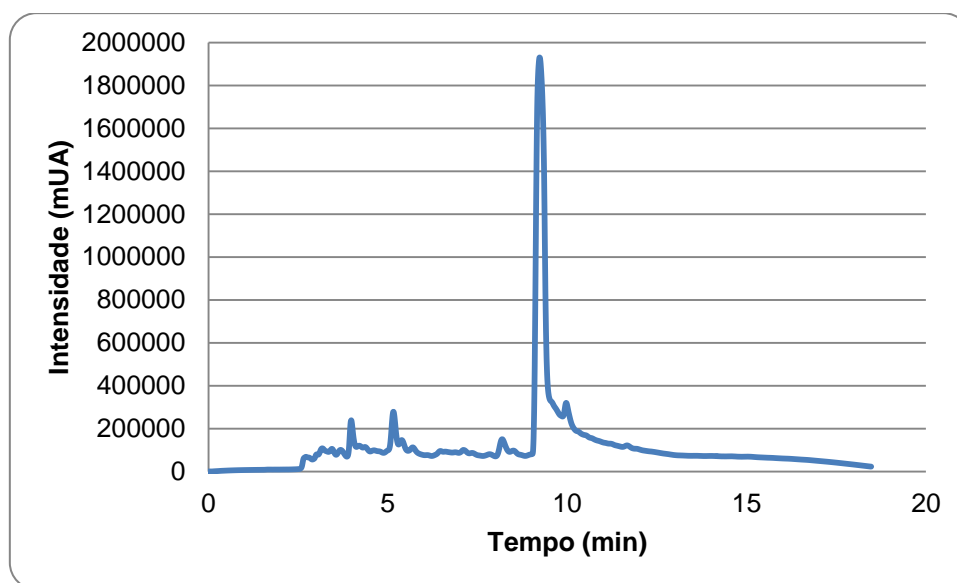
De acordo com os recentes relatórios, a correlação é positiva entre compostos fenólicos totais e a actividade antioxidante (determinado pelo método FRAP), ou seja, o valor da actividade antioxidante obtido para o método FRAP aumenta proporcionalmente em relação ao conteúdo de compostos fenólicos totais [58].

### 3.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA AMOSTRA

Primeiro identificou-se os compostos por HPLC mas como não se conseguiu identificar todos os compostos, para se ter a certeza de que os compostos estudados estão presentes na amostra confirmou-se os resultados por GC-MS.

#### 3.2.1. HPLC

Analizando o cromatograma da amostra, Figura 3.5, concentrada 4 vezes para conseguir-se obter valores dentro da gama da recta de calibração da mistura (ver página 79), detectou-se os picos que podem ser dos compostos ácido gálico (AG) e ácido protocatecuico (AP). A confirmação dos compostos é feita pelo tempo de retenção e o espectro (ver Anexo D) do analito padrão, nas mesmas condições. O tempo de retenção depende do método desenvolvido no estudo, por isso confirma-se o tempo de retenção dos compostos por comparação com o cromatograma da mistura das soluções dos compostos padrão.



**Figura 3.5:** Cromatograma de água de cozedura concentrada 4 vezes (a 280 nm).

A Tabela 3.2 apresenta a concentração dos compostos identificados na amostra de água de cozedura de cortiça.

**Tabela 3.2:** Concentração dos compostos identificados na amostra de água de cozedura de cortiça (n=3).

	Concentração mássica (mg/L)	
	AG	AP
<b>Amostra</b>	5,51 ± 0,06	5,35 ± 0,02
<b>Valores da Literatura [11]</b>	35	15

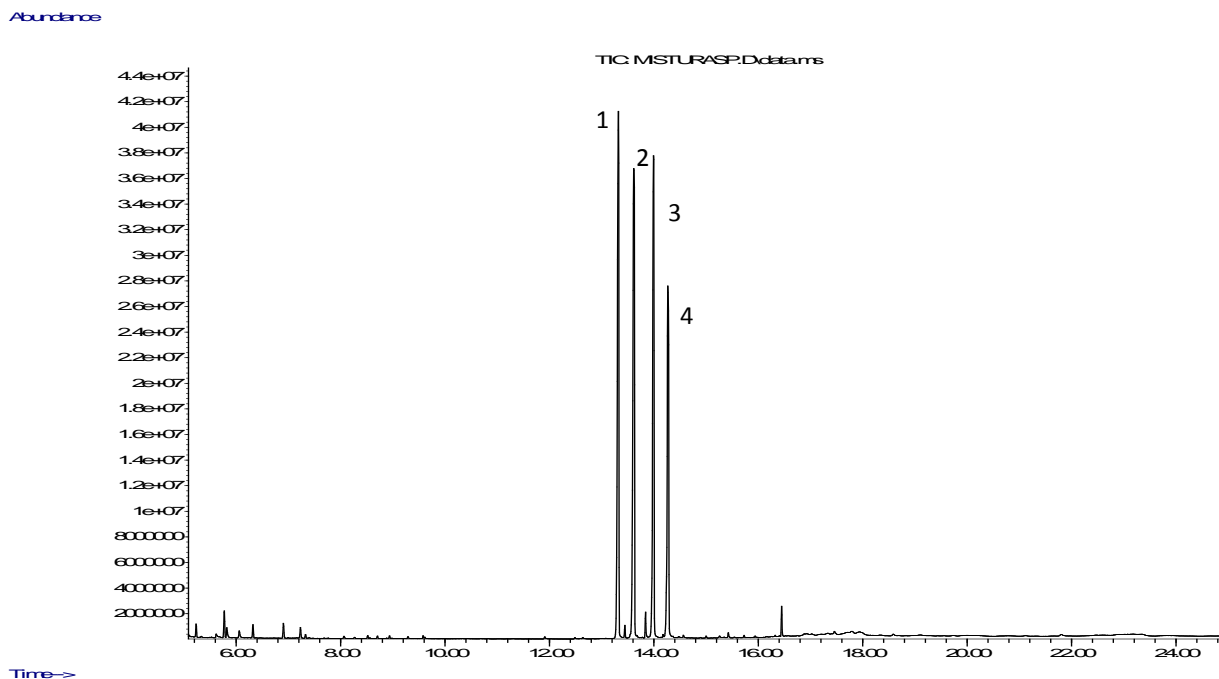
Comparando o valor obtido experimentalmente com a literatura verifica-se que a concentração de ácido gálico é inferior ao descrito, o que poderá estar relacionado com diversos factores, tais como, quantidade de paletes processadas na amostra, a água de cozedura da **Fabricor S.A.** ser filtrada no fim de cada ciclo, entre outros.

Em relação aos outros dois compostos estudados (ácido siríngico – AS e ácido vanílico – AV), não se conseguiu identificar as suas presenças na amostra. O pico maioritário no cromatograma é de uma mistura de compostos semelhantes, ocorre co-eluição dos compostos, pois este não apresenta um espectro de nenhum composto isolado conhecido. Para confirmar a presença dos compostos na amostra, analisa-se a amostra através de GC-MS (ver ponto 3.2.2).

### 3.2.2. GC-MS

Esta técnica foi utilizada para confirmação da presença dos compostos estudados na amostra. A identificação dos compostos na amostra é efectuada por comparação com a mistura das soluções dos compostos padrão, a 500 mg/L, permitindo a identificação por comparação do tempo de retenção e da relação m/z dos respectivos compostos.

Na Figura 3.6, pode-se observar o cromatograma da mistura das soluções dos compostos padrão para o método aplicado (descrito no ponto 2.3.2).



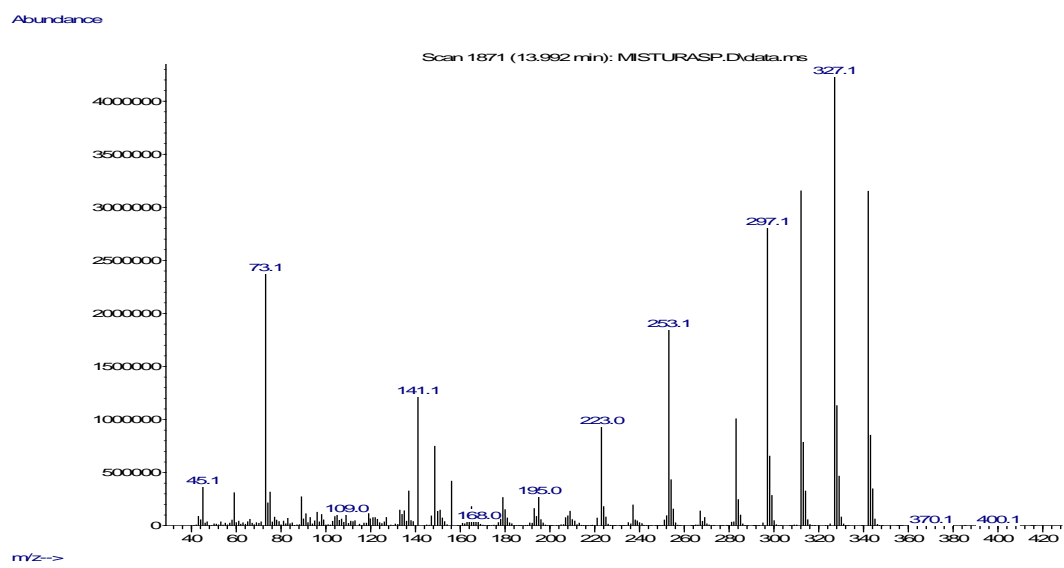
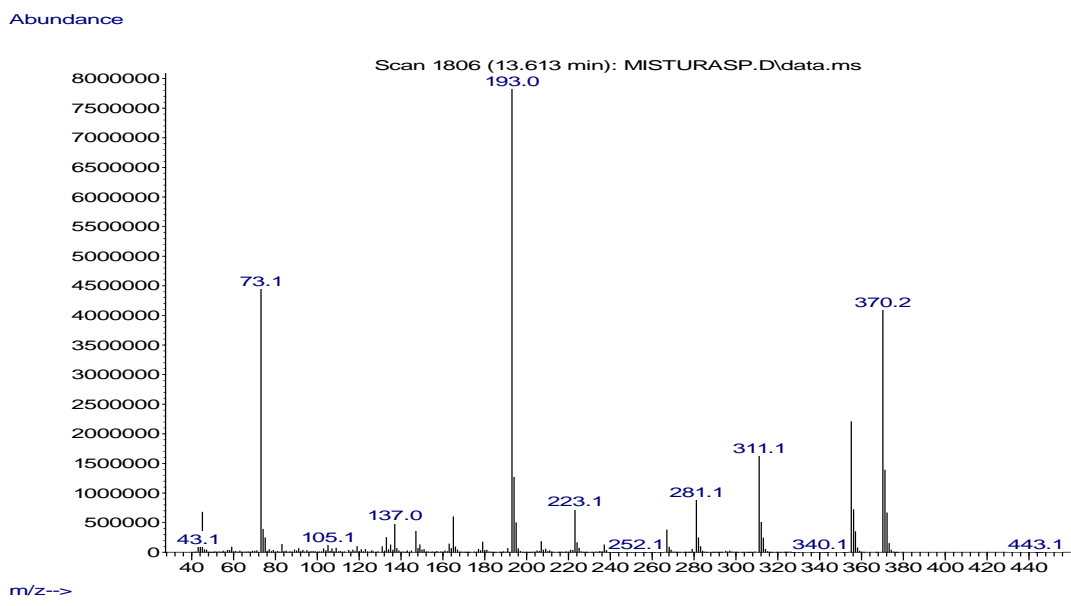
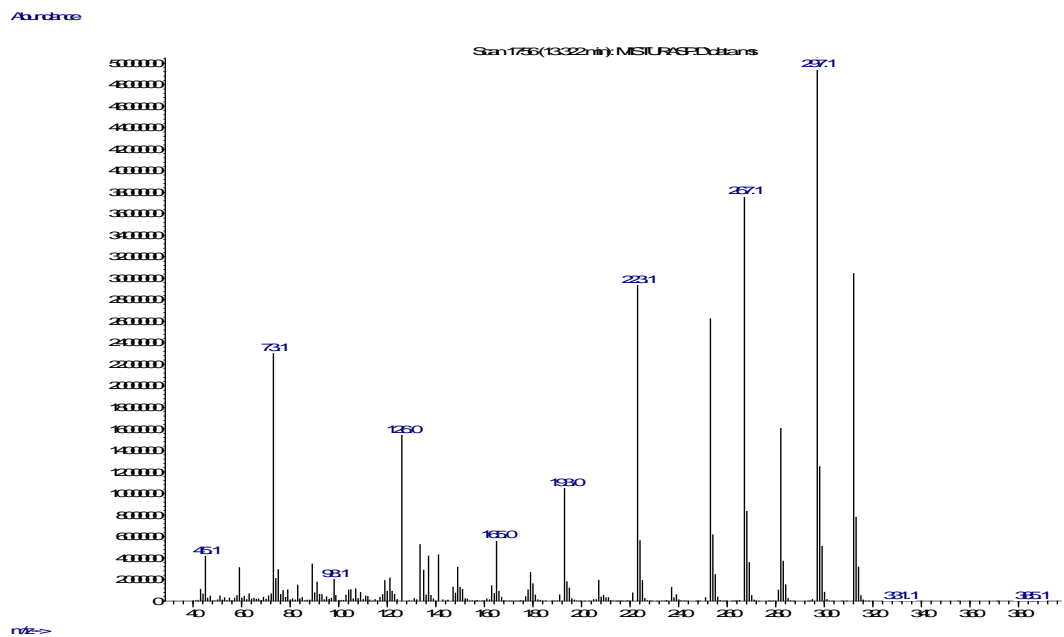
**Figura 3.6:** Cromatograma da mistura de soluções dos compostos padrão.

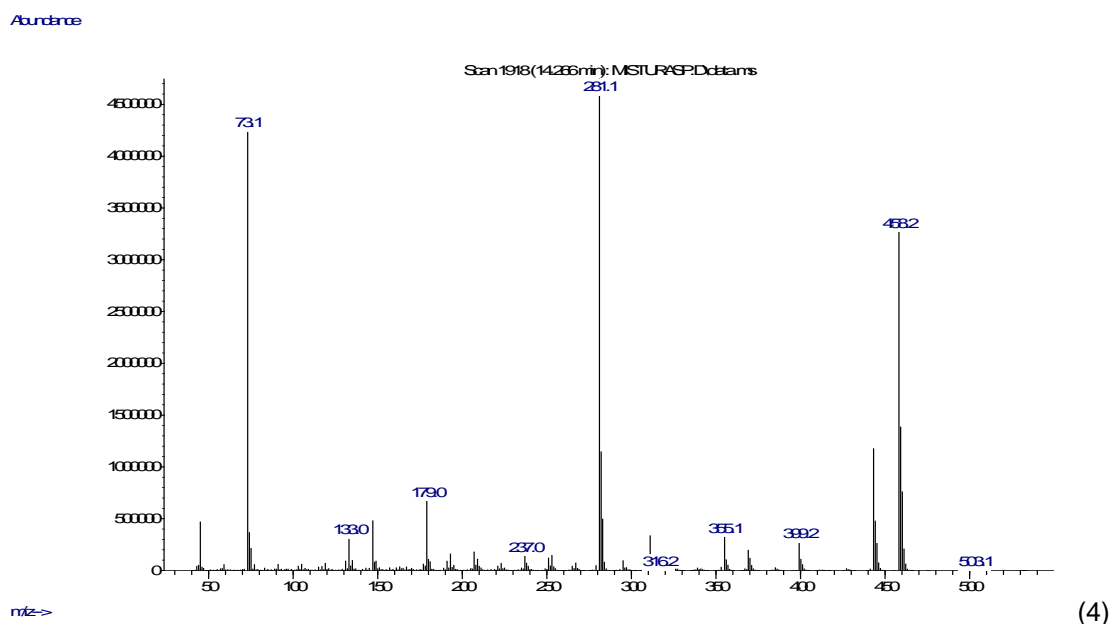
Pode-se identificar quatro picos enormes, que correspondem aos compostos estudados por serem os que estão em maior concentração na solução. A identificação dos compostos é feita por comparação, o espectro de massa obtido com o espectro apresentado na biblioteca de espectros de massa.

Na Figura 3.7 estão representados os espectros de massa obtidos para os quatro picos identificados no cromatograma. A identificação de 1 a 4 dada aos picos no cromatograma da mistura de soluções dos compostos padrão corresponde a numeração dada aos espectros de massa.

Utilizando a biblioteca, identificou-se:

- O espectro de massa (1) corresponde ao ácido vanílico;
- O espectro de massa (2) corresponde ao ácido protocatecuico;
- O espectro de massa (3) corresponde ao ácido siríngico;
- O espectro de massa (4) corresponde ao ácido gálico;





**Figura 3.7:** Espectro de massa dos picos com maior concentração na solução da mistura dos padrões (1 – AV, 2 – AP, 3 – AS e 4 – AG).

Com a identificação dos principais fragmentos obtidos nos espectros de massa também pode-se determinar qual é o composto, pois cada pico mássico  $m/z$  depende da fragmentação da estrutura química dos compostos.

Analisando os fragmentos do espectro de massa do ácido vanílico, observa-se a presença do ião molecular [ $M^+=312$ ] do ácido vanílico sililado, no entanto, a perda do grupo OTMS gera o pico mássico de  $m/z$  223 visível no espectro de massa. O fragmento de  $m/z$  165 também é um pico característico do AV, resultando da perda de dois grupos OTMS.

No caso do ácido protocatecuico, observa-se a presença do ião molecular [ $M^+=370$ ] do composto sililado. Também pode-se identificar os três fragmentos característicos pela perda de cada grupo OTMS,  $m/z$  281, 193 e 105.

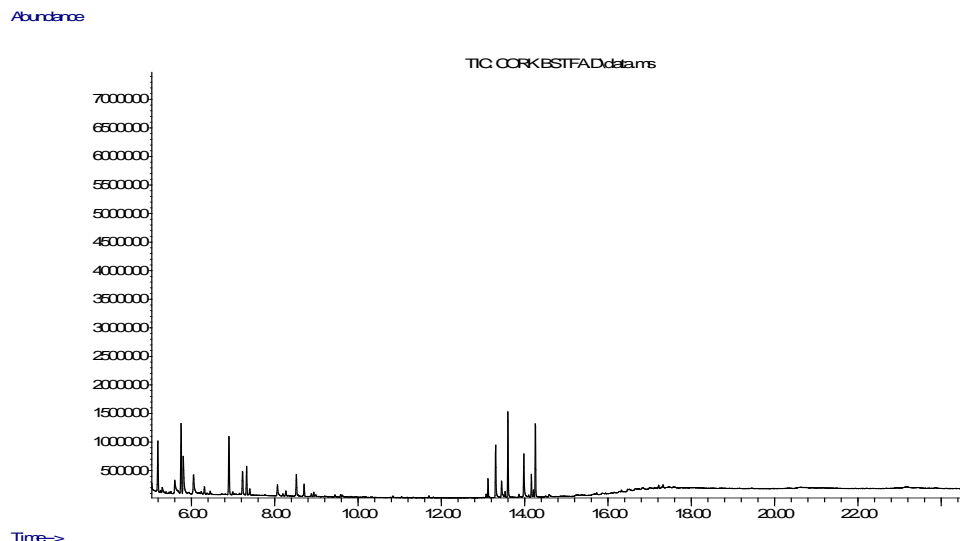
Em relação ao ácido siríngico só há dois fragmentos característicos correspondentes as perdas das ligações do grupo OH por OTMS com a derivatização da amostra. Os  $m/z$  desses fragmentos são: 253 e 163.

De todos os compostos analisados neste estudo o ácido gálico é o que apresenta quatro ligações OH antes da derivatização, por isso tem-se quatro fragmentos característicos para as perdas de cada grupo OTMS. Os  $m/z$  dos fragmentos característicos são: 370, 281, 193 e 105. Observa-se no espectro de massa do AG a presença do ião molecular [ $M^+=458$ ] do ácido gálico sililado e o fragmento característico pela perda de dois grupos OTMS.

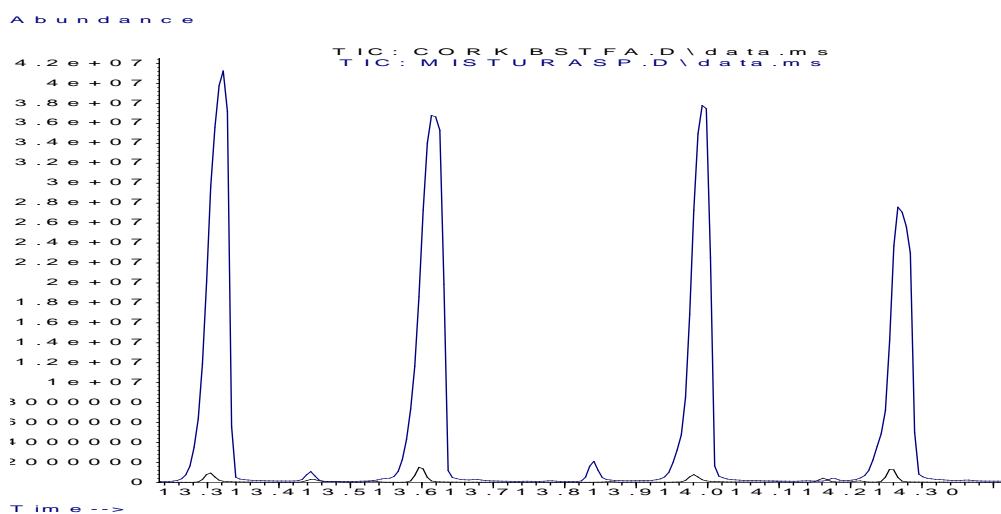


## AMOSTRA

A seguir apresenta-se o cromatograma obtido através do método experimental descrito no ponto 2.2.2 para a amostra de água de cozedura analisada no estudo (Figura 3.8).



**Figura 3.8:** Cromatograma da amostra de água de cozedura.



**Figura 3.9:** Sobreposição dos cromatogramas da amostra com a solução da mistura de soluções dos compostos padrão.

Para confirmar se os compostos estão presentes na amostra sobrepôs-se os cromatogramas analisados para comparar os tempos de retenção (Figura 3.9). Pode-se verificar pelos tempos de retenção que os compostos estudados devem estar presentes na água de cozedura. Analisando os espectros de massa da amostra (ver anexo E) conseguiu-se confirmar a presença dos compostos estudados na amostra analisada.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO TEXTURAL: ADSORÇÃO DE AZOTO A 77K

As características texturais dos carvões activados Norit (CA-1) e do carvão obtido a partir de caroços de azeitonas (CA-2) utilizados neste trabalho encontram-se na Tabela 3.3. Não foi possível obter a caracterização textural do carvão activado Norit Gac modificado com etilenodiamina, porque o equipamento avariou.

**Tabela 3.3:** Dados das caracterizações texturais dos carvões activados [16].

Carvão Activado	Área de Superfície <sup>a</sup> (m <sup>2</sup> /g)		Volume dos Poros <sup>b</sup> (cm <sup>3</sup> /g)		Diâmetro dos poros <sup>c</sup> (nm)	
	S <sub>BET</sub>	S <sub>mic</sub>	V <sub>total</sub>	V <sub>mic</sub>	D <sub>BJH</sub>	D <sub>MP</sub>
CA-1	900	616	0,57	0,32	3,61	2,55
CA-2	1301	686	0,90	0,38	3,51	2,76

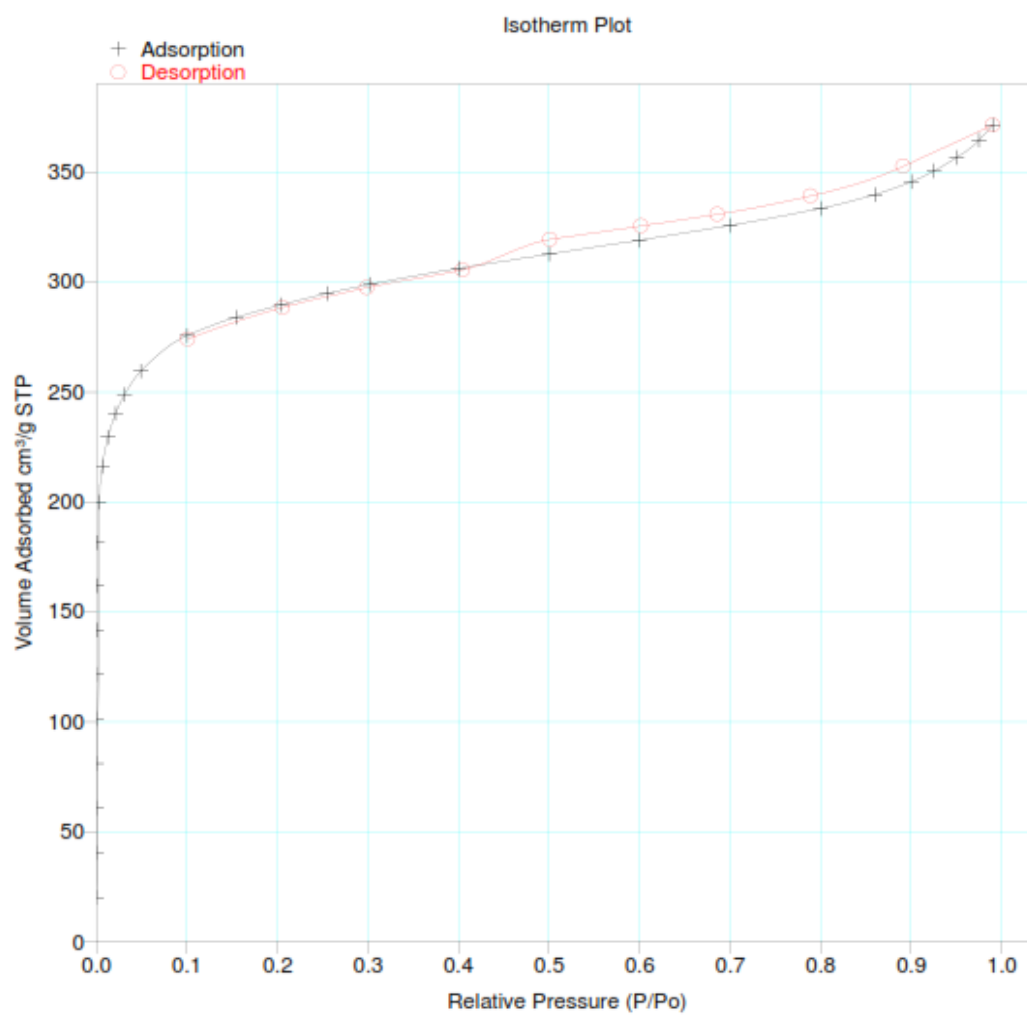
<sup>a</sup> S<sub>BET</sub> e S<sub>mic</sub> são a área superficial BET e a área de superfície microporosa (estes valores foram obtidos no método t-plot).

<sup>b</sup> V<sub>total</sub> e V<sub>mic</sub> são os volumes totais e de microporos obtidos pelo método t-plot.

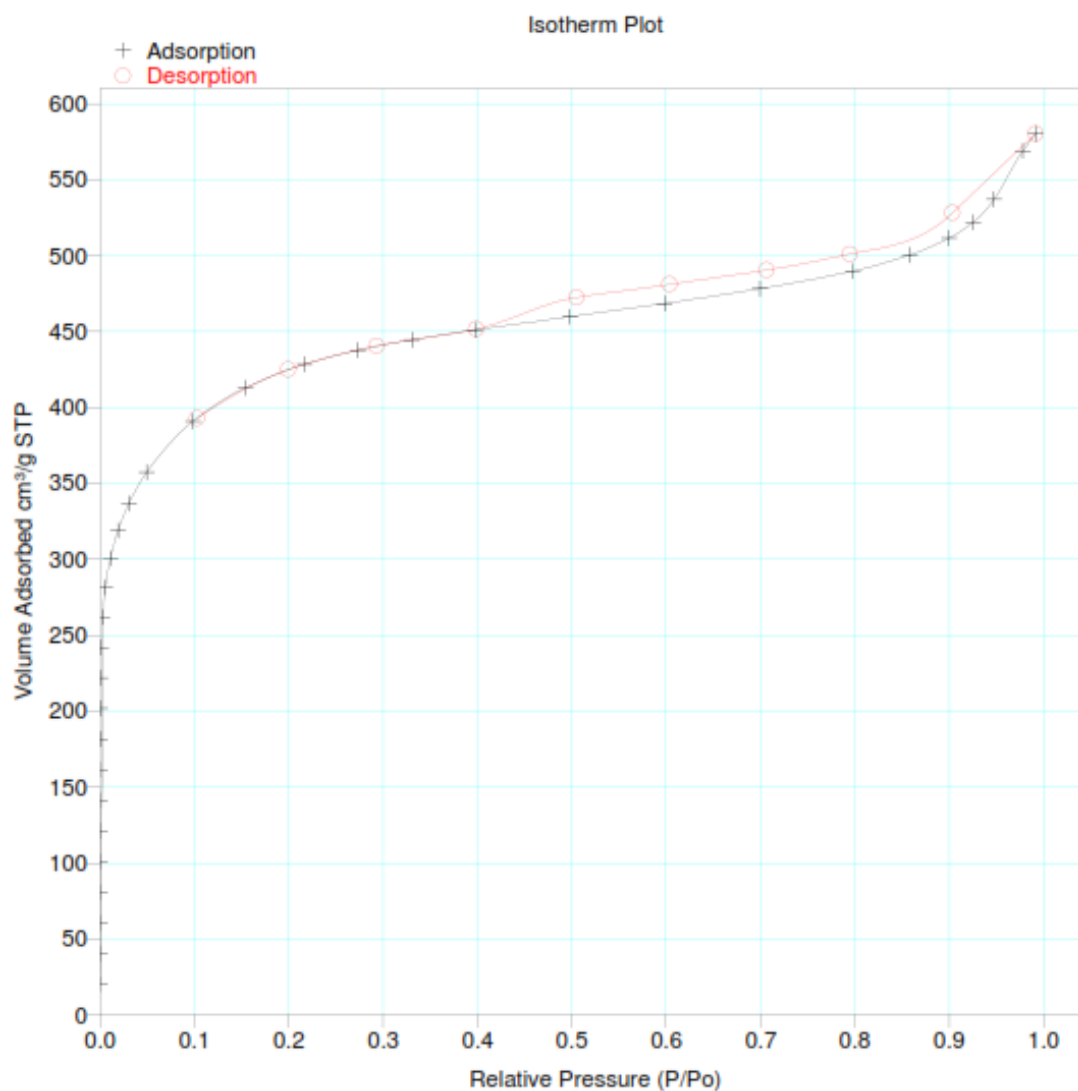
<sup>c</sup> D<sub>BJH</sub> e D<sub>MP</sub> são a BJH dessorção do diâmetro médio dos poros e a média do diâmetro dos poros.

Com base na classificação IUPAC para os diâmetros médios dos poros dos carvões activados, podemos concluir que para o carvão CA-2 os sólidos são maioritariamente mesoporosos porque apresentam diâmetro superior a 2 nm e o volume dos microporos representa 43% do volume total. No caso do carvão CA-1 os poros são maioritariamente microporosos porque o volume dos microporos representa 56% do volume total apesar do diâmetro ser superior a 2 nm.

Na Figura 3.10 e 3.11 podemos observar os gráficos da adsorção/dessorção para o CA-1 e CA-2, respectivamente. Observa-se que os carvões activados apresentam uma isotérmica característica de carácter microporoso mas apresentando também mesoporosidade. A histerese observada é do tipo H4 típica de poros estreitos em forma de fenda.



**Figura 3.10:** Gráfico da adsorção/dessorção do azoto no CA-1.



**Figura 3.11:** Gráfico da adsorção/dessorção do azoto no CA-2.

Os gráficos da isotérmica de BET e da distribuição de tamanho dos poros, determinados pelo método BJH para cada carvão activado, foram fornecidos pelo Laboratório de Análises (REQUIMTE).

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR

A Tabela 3.4 apresenta os valores da análise elementar dos carvões ativados estudados neste trabalho.

**Tabela 3.4:** Análise elementar dos carvões ativados.

Carvão Ativado	(%) Composição Elementar				
	N	C	H	S	O
CA-1	0,4	86,1	0,3	0,4	12,8
CA-2	0,2	70,2	1,2	0	28,4
CA-1M	1,9	81,4	0,3	0,1	16,3

O teor de azoto está dentro dos valores esperados para o CA-1M que foi modificado com EDA, ou seja, o teor de azoto deve ser superior ao carvão ativado não modificado (CA-1).

Quanto maior o teor de oxigénio dos carvões ativados mais ácida é a superfície do carvão. No entanto de acordo com os valores obtidos para o  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  não se observa este comportamento, provavelmente os grupos de oxigénio são grupos básicos (ex: quinonas).

### 3.5. CARACTERIZAÇÃO DA QUÍMICA DE SUPERFÍCIE ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ )

A Tabela 3.5 apresenta os resultados da caracterização da química da superfície dos carvões ativados, o valor calculado por titulação mássica para a determinação de  $\text{pH}_{\text{pzc}}$ .

**Tabela 3.5:** Caracterização da química de Superfície dos carvões ativados (n=3, M=média das replicas e DP=desvio padrão).

Carvão Ativado	$\text{pH}_{\text{pzc}}$ (M $\pm$ DP)
CA-1	6,4 $\pm$ 0,12
CA-2	11,0 $\pm$ 0,05
CA-1M	7,5 $\pm$ 0,07

Os carvões ativados (CA-2 e CA-1M) utilizados nos testes deste trabalho apresentam características básicas uma vez que  $\text{pH}_{\text{pzc}} > 7$ , e o CA-1 apresenta características ácidas uma vez que  $\text{pH}_{\text{pzc}} < 7$ .

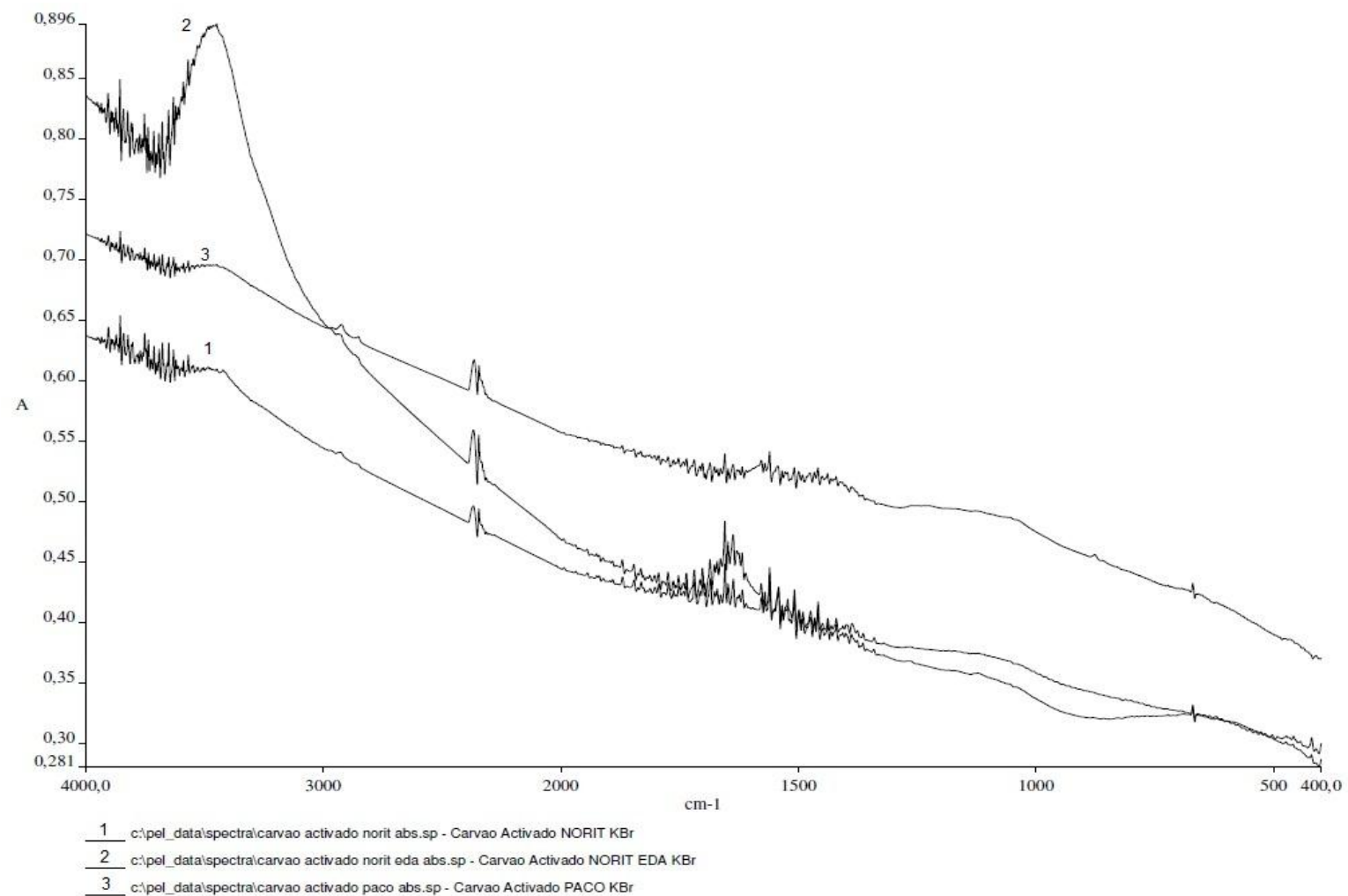
### **3.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**

A análise do espectro FTIR é uma excelente ferramenta para determinar quais os grupos funcionais presentes numa amostra sólida.

A Figura 3.12 mostra o espectro de Absorvância FTIR dos três carvões activados usados nas experiências e representa a relação entre a absorvância (eixo  $y$ ) e o número de onda (eixo  $x$ ).

A região  $1000 - 1350 \text{ cm}^{-1}$  é característica da ligação C-N e a região  $3000-3500 \text{ cm}^{-1}$  é característica da ligação N-H (aminas).

Observa-se que o espectro do CA-1M apresenta maior absorvância na região característica da ligação N-H, ou seja, este resultado indica que a modificação do carvão foi bem-sucedida pois, conseguiu-se alterar a superfície do carvão activado Norit Gac.



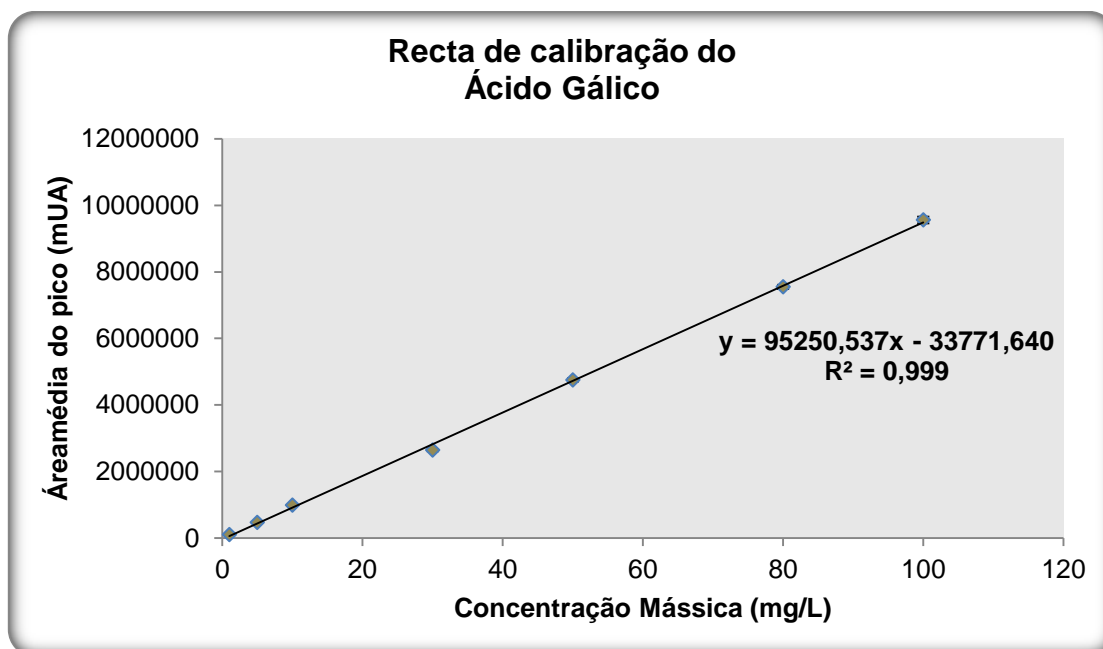
**Figura 3.12:** Espectro de Absorvância FTIR dos três carvões activados (A – absorvância).

### 3.7. TESTES DE ADSORÇÃO

A identificação e quantificação dos compostos estudados (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido siríngico e ácido vanílico) nos testes e na amostra (água de cozedura de cortiça) foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para tal, construiu-se rectas de calibração das soluções dos compostos padrão isoladas e em mistura.

As curvas de calibração foram construídas na seguinte gama de concentração 1 – 100 mg/L, porque para valores superiores a 100 mg/L não se conseguiu determinar as áreas dos picos dos cromatogramas por estes estarem saturados. As leituras foram todas feitas no comprimento de onda a 280 nm e os ensaios foram feitos em triplicado.

Na Figura 3.13 encontra-se representado graficamente a recta de calibração do ácido gálico.



**Figura 3.13:** Recta de calibração do Ácido Gálico (n=3,  $\alpha=5\%$ ).



Na Figura 3.14 encontra-se representado graficamente a recta de calibração do ácido protocatecuico.

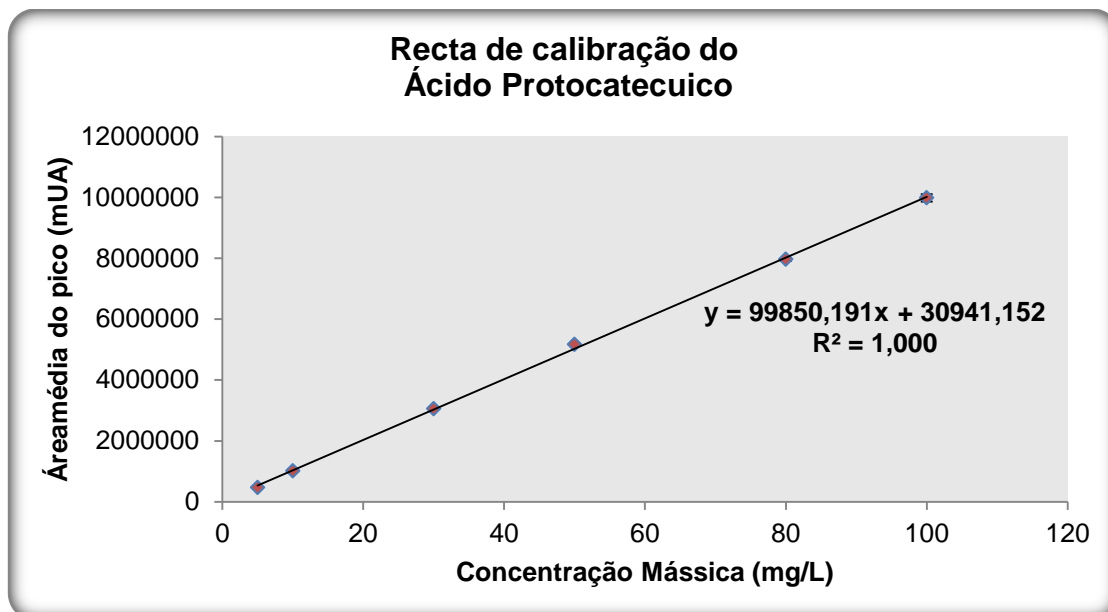


Figura 3.14: Recta de calibração do Ácido Protocatecuico (n=3,  $\alpha=5\%$ ).

Na Figura 3.15 encontra-se representado graficamente a recta de calibração do ácido siríntrico.

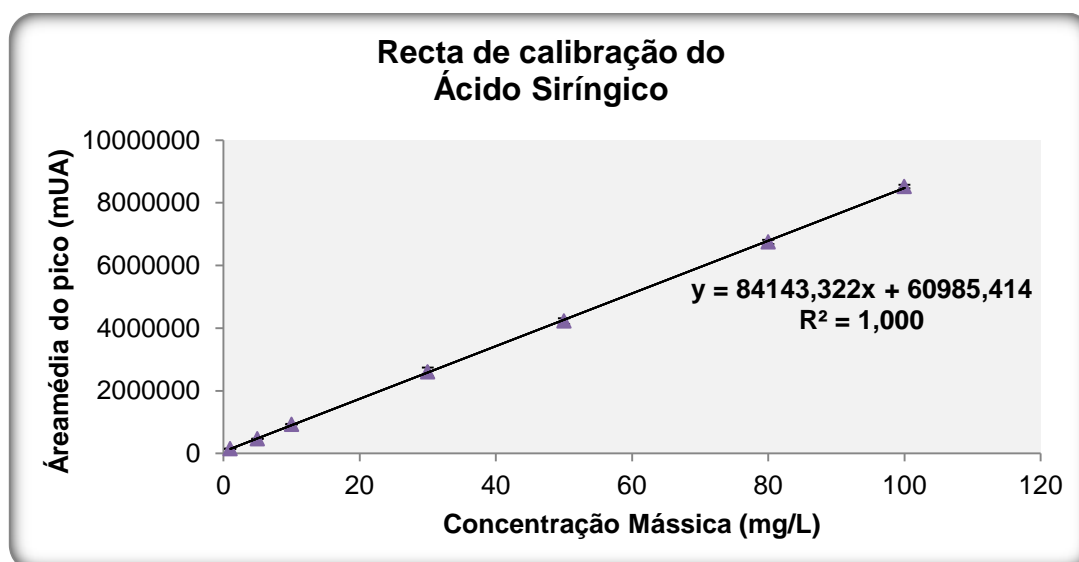
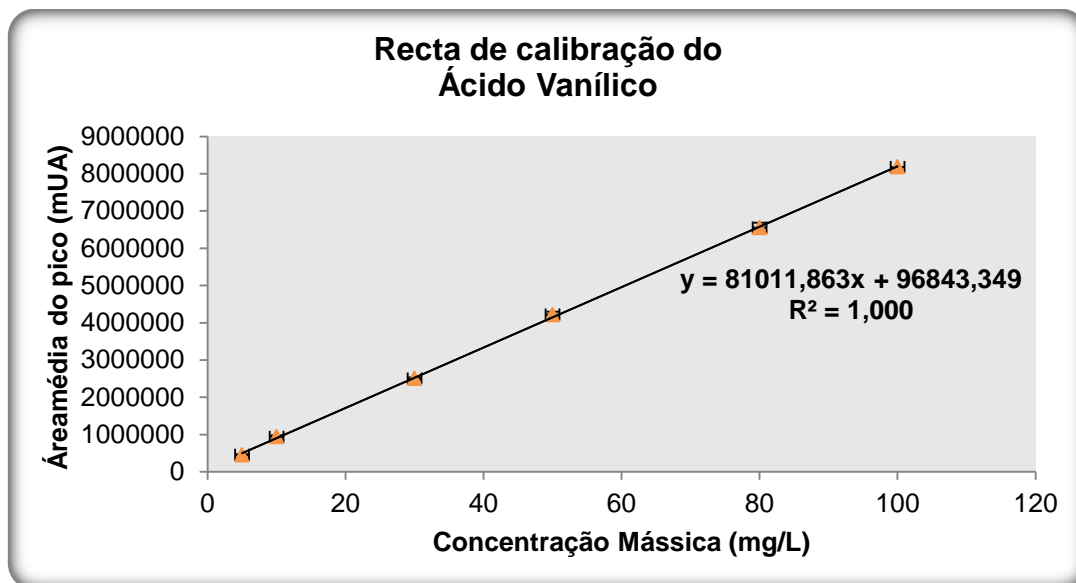


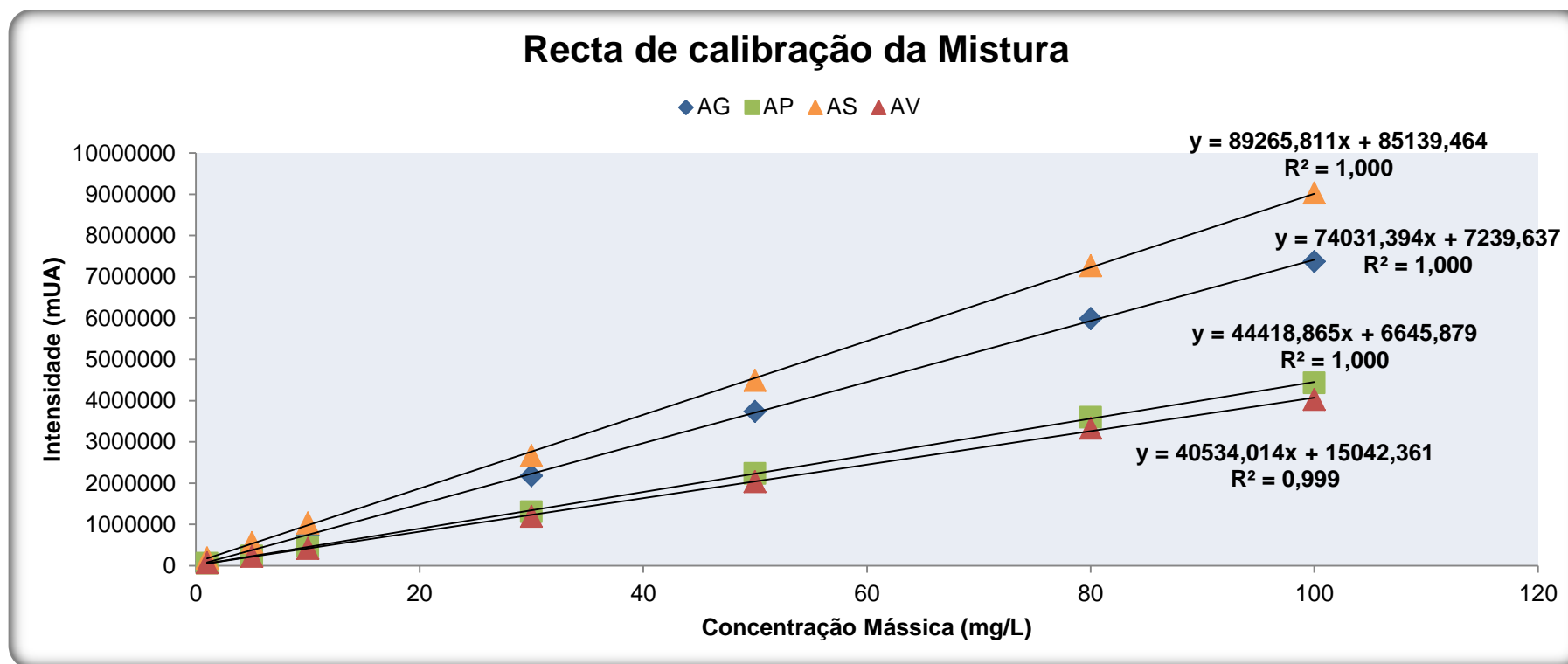
Figura 3.15: Recta de calibração do Ácido Siríntrico (n=3,  $\alpha=5\%$ ).

Na Figura 3.16 encontra-se representado graficamente a recta de calibração do ácido vanílico.



**Figura 3.16:** Recta de calibração do Ácido Vanílico (n=3,  $\alpha=5\%$ ).

Na Figura 3.17 encontra-se representado graficamente a recta de calibração da mistura das soluções dos compostos padrão.



**Figura 3.17:** Recta de calibração da Mistura ( $n=3$ ,  $\alpha=5\%$ ).

Analisando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das curvas de calibração dos compostos isolados e da mistura, observa-se que existe linearidade nos resultados obtidos. Assim sendo, as equações que descrevem as relações lineares foram utilizadas para quantificar os compostos analisados nos testes.

### 3.7.1. Cinética de Adsorção

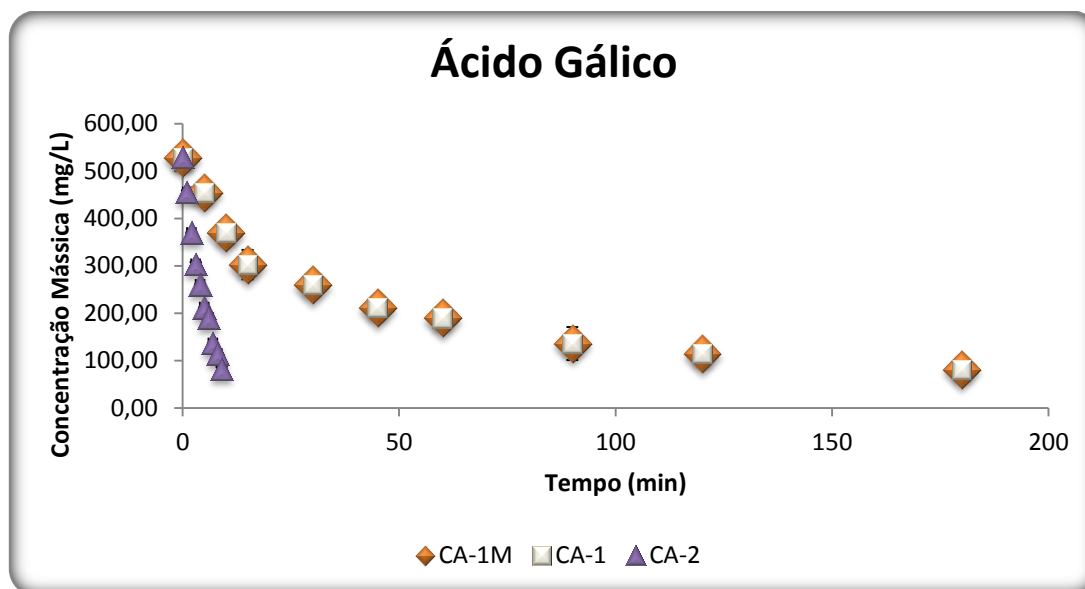
O objectivo deste teste é determinar o tempo de equilíbrio entre o adsorvato (fase líquida) e o adsorvente (fase sólida).

Todos os ensaios cinéticos foram realizados em solução-padrão (compostos isolados e mistura) com concentração inicial de 500 mg/L. Os dados experimentais foram ajustados aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, para se obter os parâmetros cinéticos e determinar qual o modelo que melhor descreve a adsorção.

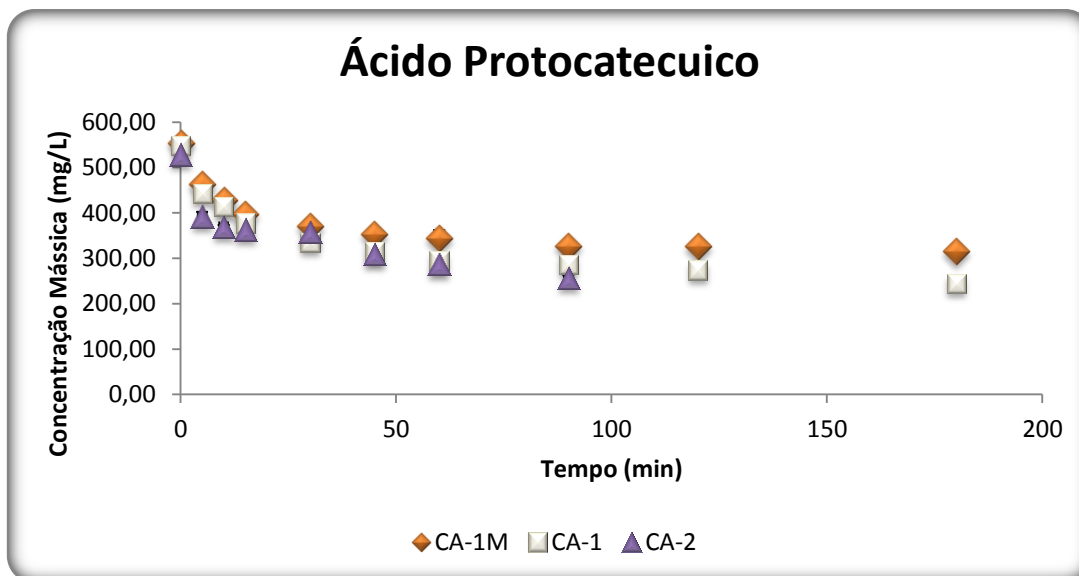
#### COMPOSTOS PADRÃO

- **Soluções dos compostos padrão Isoladas**

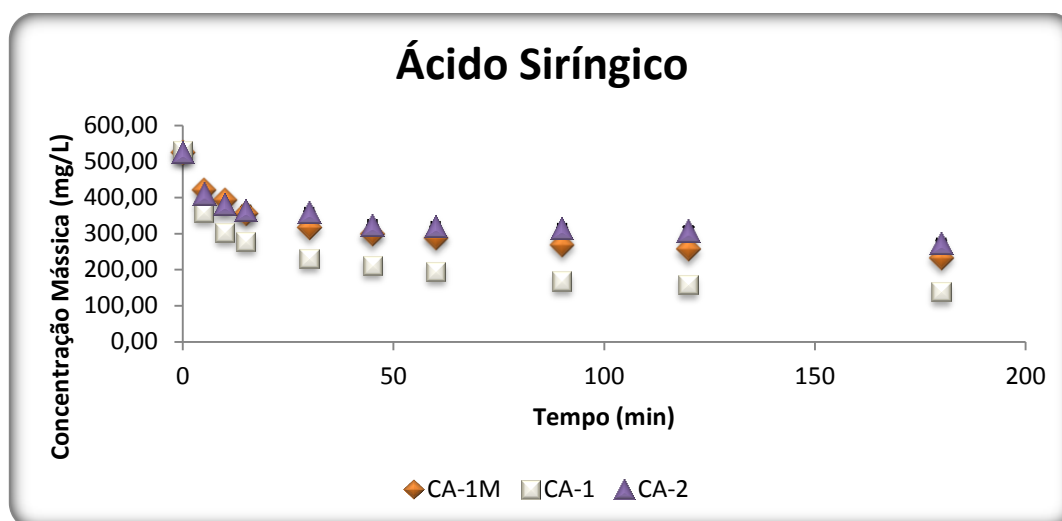
A Figura 3.18 mostra o comportamento cinético do ácido gálico em cada carvão activado. Pode-se observar que o processo de adsorção é muito mais rápido para o carvão CA-2, pois o adsorvato é completamente adsorvido ao fim de 15 min. Isto pode ocorrer porque o carvão CA-2 é mais mesoporoso (poros de transporte) e o acesso do adsorvato até aos centros de adsorção é facilitado.



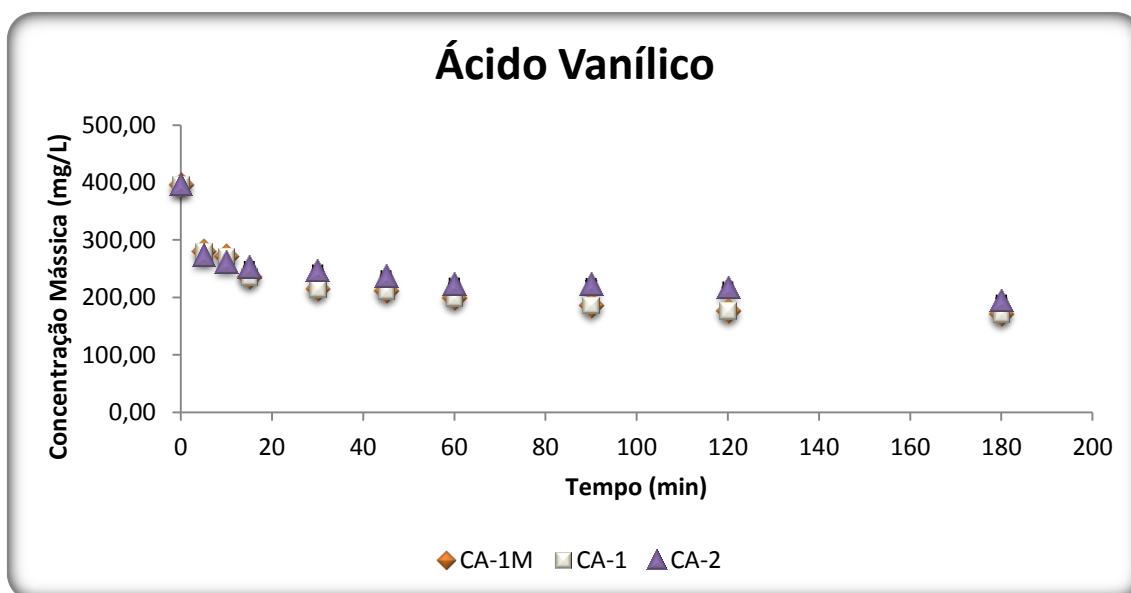
**Figura 3.18:** Comportamento cinético do Ácido Gálico nos carvões activados.



**Figura 3.19:** Comportamento cinético do Ácido Protocatecuico nos carvões activados.



**Figura 3.20:** Comportamento cinético do Ácido Siríntrico nos carvões activados.



**Figura 3.21:** Comportamento cinético do Ácido Vanílico nos carvões activados.

Observando as Figuras 3.18 a 3.21, verifica-se que a adsorção é mais rápida nos primeiros 15 min do processo, isto deve-se aos poros de transporte (mesoporos), e é mais lenta próxima ao equilíbrio. Isto ocorre porque no início do processo há uma grande quantidade de sítios vazios para a adsorção na superfície dos adsorventes. Com o passar do tempo, o número de sítios vazios diminui e começa a haver também a presença de forças repulsivas das moléculas dos compostos já adsorvidos, o que dificulta o processo de adsorção nos restantes sítios vazios [60].

O equilíbrio foi atingido após 90 min em todos os compostos estudados para cada carvão activado, excepto no caso do ácido gálico em CA-2 em que o equilíbrio não foi atingido e o composto foi completamente adsorvido ao fim de 15 min.

Os dados de cinética foram ajustados aos modelos cinéticos pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem. Os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 3.6.

Neste estudo o modelo com melhor ajuste apresenta as somas de quadrado de erros (SQE) mais baixas, isto é, o modelo cinético pseudo-segunda ordem. Significa que há um bom ajuste dos pontos calculados pelo modelo pseudo-segunda ordem em relação aos pontos experimentais dos compostos estudados para cada carvão activado.

**Tabela 3.6:** Parâmetros dos modelos cinéticos das soluções dos compostos padrão isoladas nos respectivos carvões activados.

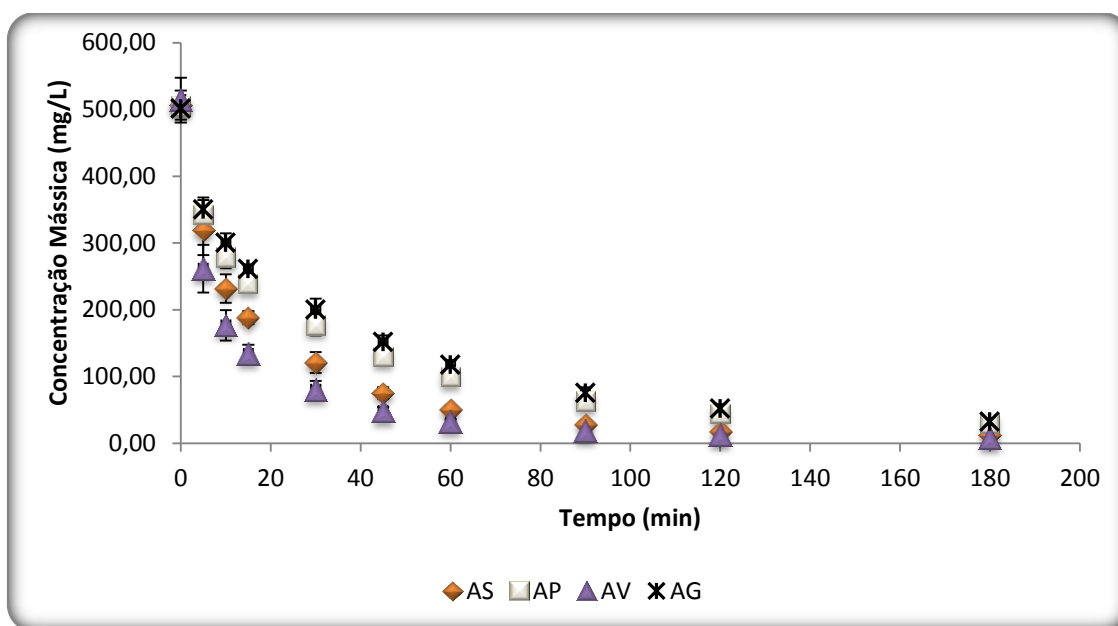
Modelos Cinéticos	Parâmetros dos modelos	Soluções dos compostos padrão Isoladas											
		AG			AP			AS			AV		
		CA-1	CA-2	CA-1M	CA-1	CA-2	CA-1M	CA-1	CA-2	CA-1M	CA-1	CA-2	CA-1M
Pseudo 1ª Ordem	$q_e$ (mg/g)	98,42	88,64	82,47	53,85	45,53	44,16	70,26	70,26	51,80	52,95	34,06	40,85
	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,053	0,521	0,039	0,067	0,117	0,083	0,098	0,098	0,069	0,138	0,192	0,112
	<b>SQE</b>	<b>384,28</b>	<b>33,22</b>	<b>232,80</b>	<b>128,41</b>	<b>262,11</b>	<b>50,25</b>	<b>238,29</b>	<b>238,29</b>	<b>122,90</b>	<b>153,63</b>	<b>93,14</b>	<b>95,37</b>
Pseudo 2ª Ordem	$q_e$ (mg/g)	108,95	90,23	92,91	58,31	51,79	48,73	74,54	43,71	55,78	55,09	34,28	42,73
	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0,001	0,108	0,001	0,002	0,003	0,002	0,002	0,005	0,002	0,004	0,012	0,004
	<b>SQE</b>	<b>78,04</b>	<b>4,73</b>	<b>58,05</b>	<b>9,40</b>	<b>145,26</b>	<b>3,10</b>	<b>18,39</b>	<b>20,83</b>	<b>8,72</b>	<b>21,62</b>	<b>10,65</b>	<b>19,93</b>

Os valores da quantidade adsorvida no equilíbrio por massa de adsorvato,  $q_e$ , estimados pelo modelo cinético pseudo-segunda ordem, apresentam valores mais próximos aos obtidos neste estudo.

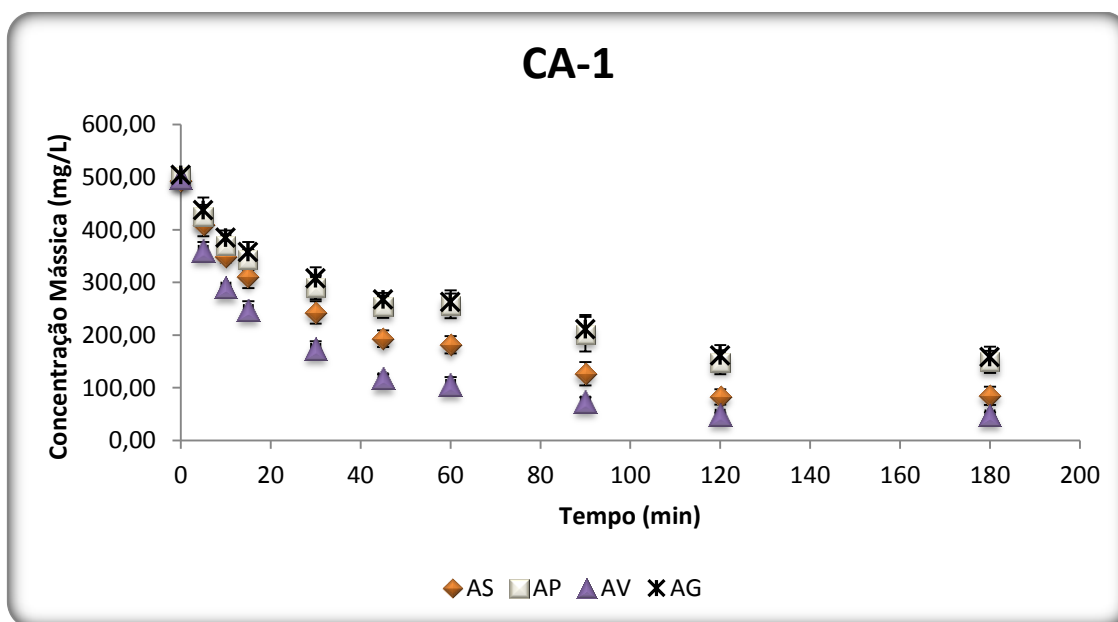
- **Mistura de Soluções dos compostos padrão**

Faz-se o estudo cinético para as soluções isoladas e para a mistura destas para se poder estudar o efeito das interações dos compostos.

As Figuras 3.22, 3.23 e 3.24 descrevem o comportamento cinético da mistura de soluções padrão para cada carvão activado estudado.

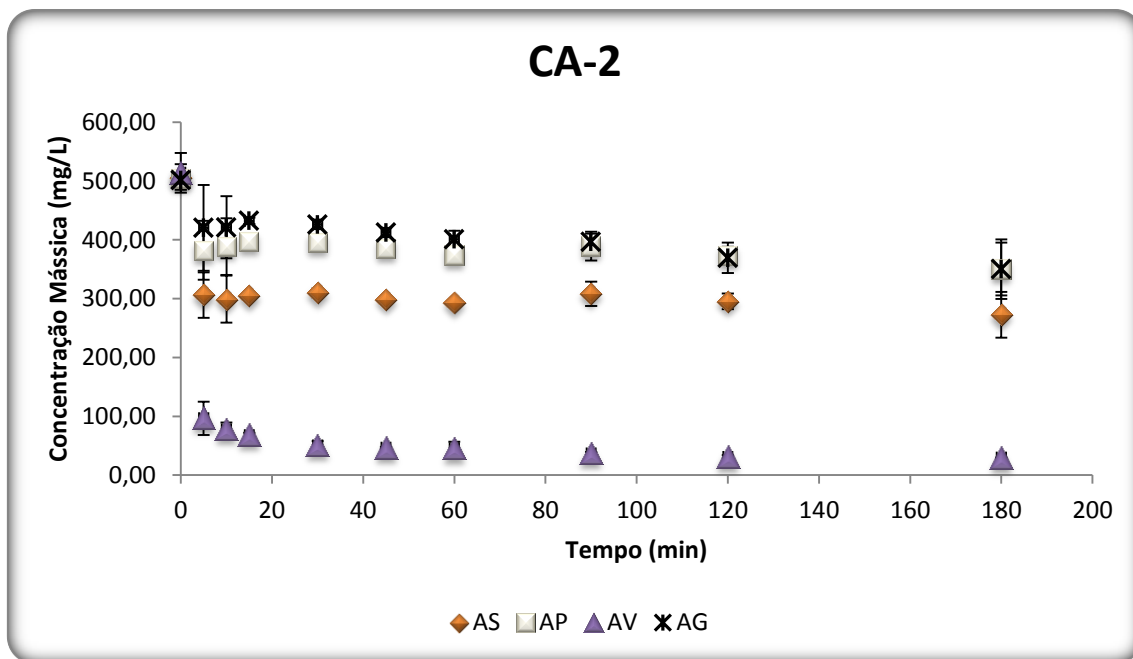


**Figura 3.22:** Comportamento cinético da mistura de soluções dos compostos padrão no CA-1M.



**Figura 3.23:** Comportamento cinético da mistura de soluções dos compostos padrão no CA-1.





**Figura 3.24:** Comportamento cinético da mistura de soluções dos compostos padrão no CA-2.

Considerando que o processo de adsorção varia quando os compostos estão isolados ou em mistura deve-se estudar o efeito da interação ( $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i}$ ) entre os compostos para o modelo que apresenta melhor ajuste aos dados experimentais, ou seja, para o modelo cinético pseudo-segunda ordem.

A partir da relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i}$  pode-se tirar três conclusões:

- Quando a relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i} > 1$ , a adsorção de um dos componentes é favorecida pela presença do outro componente;
- Quando a relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i} = 1$ , não existe interação entre as espécies adsorvidas;
- Quando a relação  $q_{\text{mix},i}/q_{\text{mono},i} < 1$ , a adsorção de um dos componentes é desfavorecida pela presença do outro componente.

**Tabela 3.7:** Efeito da interação dos compostos para o estudo cinético.

	Efeitos da interação		
	CA-1	CA-2	CA-1M
<b>AG</b>	0,631	0,206	1,008
<b>AP</b>	1,166	0,453	1,971
<b>AS</b>	1,186	0,938	1,873
<b>AV</b>	1,760	2,771	2,445

O ácido gálico só apresenta interacção favorável com os outros compostos presentes na solução no carvão activado Norit modificado, ou seja, a competição melhorou a capacidade de adsorção e a velocidade de difusão no interior das partículas do adsorvente.

O ácido protocatecuico e o ácido siríngico só apresentam interacção desfavorável com os outros compostos no adsorvente CA-2, ou seja, a competição piorou a capacidade de adsorção e a velocidade de difusão no interior das partículas do adsorvente.

O ácido vanílico apresenta interacção favorável na presença dos outros compostos em todos os carvões activados estudados neste trabalho, mas a interacção é muito mais favorável com o CA-2 do que com outros carvões activados.

**Tabela 3.8:** Parâmetros dos modelos cinéticos da mistura de soluções dos compostos padrão nos respectivos carvões activados.

Modelos Cinéticos	Parâmetros dos modelos	Mistura de Soluções dos compostos padrão											
		CA-1				CA-2				CA-1M			
		AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV
Pseudo 1ª Ordem	$q_e$ (mg/g)	65,86	66,21	78,75	85,66	21,40	24,63	41,81	93,52	86,30	87,73	93,80	96,55
	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	0,031	0,035	0,035	0,058	0,148	1,110	0,638	0,421	0,051	0,061	0,080	0,121
	<b>SQE</b>	<b>177,90</b>	<b>236,57</b>	<b>153,39</b>	<b>153,75</b>	<b>208,33</b>	<b>67,69</b>	<b>39,05</b>	<b>67,89</b>	<b>366,47</b>	<b>326,61</b>	<b>198,65</b>	<b>171,10</b>
Pseudo 2ª Ordem	$q_e$ (mg/g)	68,80	68,00	88,41	96,94	18,60	23,47	40,99	94,98	93,62	96,07	104,48	104,48
	$k_2$ (g mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,001	0,001	0,001	0,001	0,037	100,613	0,284	0,014	0,001	0,001	0,001	0,002
	<b>SQE</b>	<b>19,42</b>	<b>24,46</b>	<b>13,92</b>	<b>9,89</b>	<b>30,67</b>	<b>15,37</b>	<b>8,70</b>	<b>5,07</b>	<b>62,60</b>	<b>40,87</b>	<b>11,15</b>	<b>3,74</b>

Os dados experimentais de adsorção para a mistura apresentam melhor ajuste ao modelo cinético pseudo-segunda ordem, sendo este modelo é o mais indicado para descrever o processo de adsorção dos compostos fenólicos em carvões activados.

### **3.7.2. Isotérmica de Adsorção**

O objectivo deste estudo é determinar a capacidade de adsorção no equilíbrio, de cada composto fenólico e da mistura das soluções dos compostos padrão, para os carvões activados estudados neste trabalho. Para isso, os dados experimentais foram ajustados aos modelos de Langmuir e de Freundlich.

Os parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich foram determinados utilizando as equações descritas no ponto 1.4.4.2 Os valores estimados dos parâmetros das isotérmicas e o SQE estão apresentados na Tabela 3.9 e 3.10, para os compostos isolados e a mistura dos compostos, respectivamente.

Para os compostos isolados o modelo de Langmuir foi adequado para ajustar os dados experimentais de equilíbrio dos seguintes compostos (e respectivos carvões activados): AG (CA-2), AP (CA-1 e CA-1M), AS (CA-1 e CA-1M) e AV (CA-1 e CA-2), (SQE é menor do que o do modelo de Freundlich). Nos restantes casos o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais é o modelo de Freundlich.

Relativamente à adsorção da mistura dos compostos, o modelo de Langmuir foi adequado para ajustar os dados experimentais de equilíbrio dos seguintes CA (e respectivos compostos): CA-2 (AP e AS) e CA-1M (AG). Nos restantes casos o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais é o modelo de Freundlich.

Também é importante verificar qual dos compostos tem maior afinidade para com os carvões activados tendo em conta os modelos com melhor ajuste. Quanto maior for o valor das constantes de Langmuir e Freundlich, maior é a afinidade do composto com o carvão [60].

Pode-se concluir, comparando as constantes, que o AV é o composto com maior afinidade para os três carvões activados estudados e para a mistura de soluções os compostos apresentam maior afinidade para o CA-1.

**Tabela 3.9:** Parâmetros dos modelos isotérmicos das soluções dos compostos padrão isoladas nos respectivos carvões activados.

		Soluções dos compostos padrão Isoladas											
		AG			AP			AS			AV		
Modelos	Parâmetros dos modelos	CA-1	CA-2	CA-1M	CA-1	CA-2	CA-1M	CA-1	CA-2	CA-1M	CA-1	CA-2	CA-1M
Langmuir	$q_{\max}$ (mg/g)	116,28	170,70	88,11	85,12	73,11	69,75	107,16	63,48	81,62	76,60	54,54	71,74
	$k_L$ (L/mg)	0,070	0,051	0,030	0,059	0,067	0,061	0,088	0,089	0,131	0,395	0,212	0,163
	SQE	13,08	87,67	28,98	25,89	72,71	55,69	26,78	10,14	6,29	141,22	37,09	40,46
Freundlich	$n$	3,22	2,01	3,64	2,91	3,15	3,00	3,80	3,78	5,11	20,03	8,04	5,61
	$k_F$ (mg/g).(L/mg) <sup>1/n</sup>	27,00	19,40	18,47	16,68	16,35	14,35	31,41	18,53	33,13	59,42	30,68	32,20
	SQE	12,48	93,45	21,91	28,50	70,93	58,45	34,37	9,05	9,59	153,47	41,31	30,92

**Tabela 3.10:** Parâmetros dos modelos isotérmicos da mistura de soluções dos compostos padrão nos respectivos carvões activados.

		Mistura das Soluções dos compostos padrão											
		CA-1				CA-2				CA-1M			
Modelos	Parâmetros dos modelos	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV
Langmuir	$q_{\max}$ (mg/g)	76,79	82,38	93,73	91,30	95,66	205,30	207,30	99,82	55,12	57,27	69,39	82,55
	$k_L$ (L/mg)	0,372	0,198	0,270	0,380	0,140	0,009	0,019	0,291	0,103	0,206	0,354	0,398
	SQE	24,84	11,78	17,94	76,00	82,95	145,82	117,10	97,10	16,88	22,09	24,03	46,62
Freundlich	$n$	11,20	7,79	5,54	5,57	5,30	1,44	1,38	4,63	10,71	7,63	6,72	5,87
	$k_F$ (mg/g).(L/mg) <sup>1/n</sup>	51,01	44,73	45,15	46,66	39,29	4,09	6,25	44,07	31,90	30,94	38,29	43,59
	SQE	8,53	1,25	6,39	29,10	20,61	154,00	159,37	33,29	35,98	9,50	13,26	18,97

### 3.7.3. Adsorção/Dessorção

A adsorção foi quantificada tendo em conta a quantidade que ficou por adsorver na solução ao fim de 1 hora e a quantidade inicial que se colocou nos frascos.

A dessorção foi quantificada tendo em conta a quantidade que se conseguiu dessorver do carvão com 4 mL de acetonitrilo, durante 20 minutos no banho de ultrasons.

## COMPOSTOS PADRÃO

### ○ Soluções dos compostos padrão Isoladas

A Tabela 3.11 apresenta os resultados obtidos para os testes de adsorção e dessorção dos compostos isolados. O melhor e o pior composto para ser adsorvido pelos três carvões activados, é o ácido gálico e o ácido protocatecuico, respectivamente. No caso do processo de dessorção, o melhor e o pior composto dessorvido varia para cada carvão activado.

**Tabela 3.11:** Quantificação de adsorção e dessorção dos compostos isolados (n=3).

CA	Concentração Mássica (mg/L)							
	Adsorção				Dessorção			
	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV
CA-1	433,48	257,52	301,15	342,96	101,71	48,84	45,83	21,68
CA-2	450,73	172,42	176,69	273,13	41,60	95,49	109,07	35,31
CA-1M	441,65	212,44	211,50	218,29	58,76	65,36	107,69	156,33

Para se calcular a percentagem de adsorção determinou por HPLC a concentração inicial das soluções dos compostos padrão.

**Tabela 3.12:** Percentagem de adsorção e dessorção dos compostos isolados.

CA	% Adsorção				% Dessorção			
	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV
CA-1	82,1	46,9	57,3	72,1	23,5	19,0	15,2	6,3
CA-2	85,3	31,4	33,6	57,4	9,2	55,4	61,7	12,9
CA-1M	83,6	38,7	40,2	45,9	13,3	30,8	50,9	71,6

Com base na Tabela 3.12, observa-se que o melhor carvão para o processo de adsorção é o carvão CA-1 (carvão activado Norit Gac) por este apresentar maior percentagem de adsorção dos compostos fenólicos estudados do que os restantes carvões activados porque os ácidos fenólicos estudados têm tamanhos da ordem dos microporos logo são facilmente adsorvidos por carvões microporosos.

No processo de dessorção é o carvão CA-1M (carvão activado Norit Gac modificado com etilenodiamina) por este apresentar maior percentagem de dessorção dos compostos fenólicos estudados do que os restantes carvões activados porque as forças de Van der Waals são menos fortes neste carvão devido à modificação da superfície do carvão.

Como não se podem usar dois carvões activados, um para cada processo, tem que se seleccionar o melhor carvão tendo em conta o processo de dessorção porque o processo de adsorção pode ser melhorado, aumentando a quantidade de carvão activado utilizado, enquanto para o processo de dessorção, não há uma maneira eficiente de melhorá-lo.

O melhor carvão activado dos estudados é o CA-1M para a adsorção e dessorção de compostos fenólicos.

#### ○ Mistura de Soluções dos compostos padrão equimolares

A Tabela 3.13 apresenta os resultados obtidos para os testes de adsorção e dessorção da mistura de soluções dos compostos padrão. O melhor e o pior composto para ser adsorvido pelos três carvões activados, é o ácido vanílico e o ácido protocatecuico, respectivamente. No processo de dessorção, o melhor e o pior composto dessorvido pelos carvões activados estudados, é o ácido vanílico e o ácido gálico.

**Tabela 3.13:** Quantificação de adsorção e dessorção da mistura de soluções dos compostos padrão (n=3).

CA	Concentração Mássica (mg/L)							
	Adsorção				Dessorção			
	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV
CA-1	285,92	263,62	310,07	336,82	101,71	48,84	45,83	21,68
CA-2	339,65	254,68	356,54	436,60	41,60	95,49	109,07	35,31
CA-1M	257,17	263,26	278,03	320,79	58,76	65,36	107,69	156,33

**Tabela 3.14:** Percentagem de adsorção e dessorção da Mistura de Soluções dos compostos padrão.

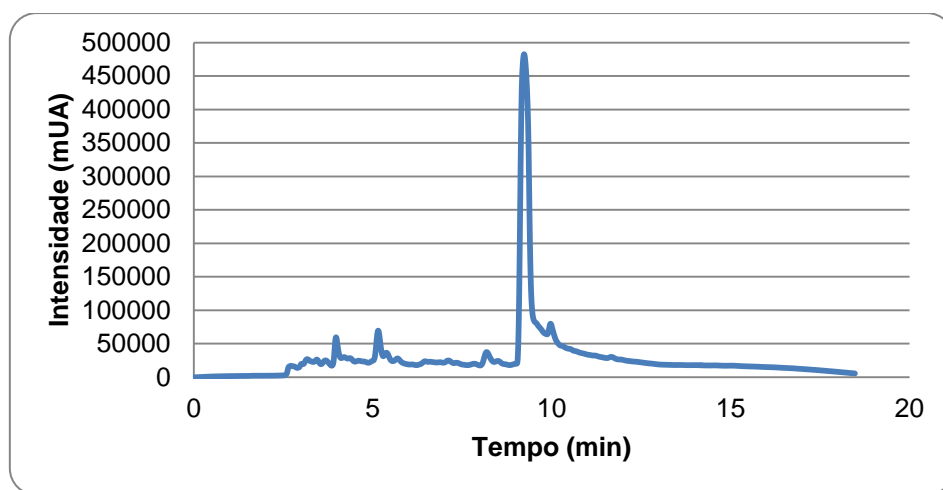
CA	% Adsorção				% Dessorção			
	AG	AP	AS	AV	AG	AP	AS	AV
CA-1	56,8	52,6	62,9	67,7	16,1	21,4	38,7	54,2
CA-2	<u>67,4</u>	<u>50,8</u>	<u>72,3</u>	<u>87,7</u>	7,1	13,5	34,3	60,2
CA-1M	51,1	52,45	56,4	64,4	13,9	19,00	50,7	69,5

Com base na Tabela 3.14, observa-se que o melhor carvão para a adsorção de misturas equimolares é o carvão CA-2 porque o processo de adsorção é competitivo entre os adsorvatos. Para o processo de dessorção o melhor carvão activado para a adsorção de misturas dos compostos padrão é o CA-1M pelas mesmas razões apresentadas para adsorção dos compostos padrão isolados.

Assim sendo, o carvão que deve ser seleccionada para a adsorção dos compostos isolados e para a mistura é o carvão CA-1M.

## AMOSTRA

A amostra de água de cozedura analisada neste teste foi previamente concentrada no Rotavapor com linha de azoto e depois filtrada com filtro de poro 0,45 µm, para remover as partículas em suspensão antes de se injectar no HPLC. Só se quantificou os compostos identificados por HPLC. A amostra encontra-se concentrada 4 vezes.



**Figura 3.25:** Cromatograma da amostra de água de cozedura de cortiça concentrada a 280 nm.



Não se conseguiu quantificar a concentração adsorvida dos compostos presentes na amostra, por este valor ser inferior a gama de concentrações usada para construir a recta de calibração e, por isso, admite-se que os compostos foram completamente adsorvidos. As Tabela 3.15 e a Tabela 3.16 apresentam a concentração mássica dos compostos dessorvidos e a percentagem de dessorção da amostra de água de cozedura, respectivamente.

**Tabela 3.15:** Concentração de AG e AP dessorvido da amostra de água de cozedura (n=3, M=média das replicas e DP=desvio padrão).

CA	Concentração mássica (mg/L) (M ± DP)	
	AG	AP
CA-1	4,56 ± 0,35	1,04 ± 0,31
CA-2	4,40 ± 1,25	2,84 ± 0,46
CA-1M	11,59 ± 0,59	5,32 ± 0,45

**Tabela 3.16:** Percentagem de dessorção da amostra de água de cozedura.

CA	% Dessorção	
	AG	AP
CA-1	20,7	4,9
CA-2	19,9	13,3
CA-1M	52,6	24,9

O carvão com melhores resultados para o processo de dessorção dos compostos estudados na amostra é o CA-1M pelas mesmas razões apresentadas anteriormente.



## **4. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO**



## 4.1. CONCLUSÕES

O objectivo deste estudo é a valorização e extracção dos compostos fenólicos, presentes nas águas efluentes produzidas no processo de transformação da cortiça da indústria corticeira Fabricor, para possível uso de outras indústrias (e.g.: indústria alimentar, indústria cosmética, entre outros).

Para se saber o valor destas águas é necessário determinar a quantidade de matéria orgânica presente nas águas (CQO, COT e pH), o teor de compostos fenólicos totais pela método de Folin-Ciocalteu, avaliar a capacidade antioxidante recorrendo a duas metodologias diferentes (captura do radical DPPH $\cdot$  e FRAP).

Os resultados obtidos para a quantidade de matéria orgânica presente nas águas são superiores ao descrito na literatura o que indica que esta amostra encontra-se mais rica em matéria orgânica do que os outros testes, isto pode dever-se a vários factores: quantidade de matéria-prima processada na água, o tipo de lote de cortiça, entre outros. Em relação ao teor de compostos fenólicos presentes na amostra obteve-se valores ligeiramente superiores ao descrito na literatura. Na análise da actividade antioxidante pelos métodos da captura do radical DPPH $\cdot$  e FRAP, concluiu-se que a amostra apresenta elevada capacidade antioxidante porque apresenta ARP maior do que a do ácido gálico (o ácido gálico é considerado um dos compostos com maior capacidade antioxidante). Foi ainda determinado o valor de  $EC_{50}$  = 0,0774 mL de amostra/  $\mu$ mol de DPPH $\cdot$  (quanto menor, mais elevada a capacidade antioxidante) para a amostra estudada.

Tal como esperado, em conformidade com estudos anteriores descritos na literatura, os resultados mostraram que a amostra é um efluente ácido, com uma cor castanha escura, um elevado conteúdo orgânico (CQO e COT) e um elevado teor de compostos fenólicos e elevada actividade antioxidante.

Escolheu-se o método de extracção em fase sólida de entre outros métodos (como por exemplo: extracção com fluídos supercríticos, extracção líquido-líquido, etc.), por este método ser mais barato e com bons resultados na adsorção de compostos fenólicos. Este estudo incidiu sobre a extracção dos seguintes compostos, ácido gálico, protocatecuico, siríngico e vanílico, pois segundo Minhalma (2001) [11] estes são os compostos fenólicos mais abundantes na água de cozedura de cortiça. No processo de extracção em fase sólida utilizaram-se dois tipos de carvões activados (Norit GAC (comercial) e um carvão obtido a partir de caroços de azeitona).

Procedeu-se a caracterização textural dos carvões activados de modo a obter os parâmetros texturais (área específica, volume poroso e distribuição de tamanho de poros). O carvão CA-2 é maioritariamente mesoporoso e o CA-1 é mais microporoso. Ambos os carvões activados apresentam isotérmicas de adsorção/dessorção do tipo I e histereses tipo H4. Com base nos resultados dos parâmetros texturais o CA-2 pode apresentar melhor capacidade de adsorção do que o CA-1, porque apresenta maior área superficial específica.

Como actualmente têm-se desenvolvido métodos para melhorar a selectividade do carvão activado alterando a química superficial, optou-se também por incluir este método no trabalho com vista a melhorar a extracção dos antioxidantes da amostra. A superfície foi modificada usando etilenodiamina, uma vez que já havia estudos com o intuito de melhorar o processo de adsorção e dessorção de antioxidantes. Confirmou-se que a modificação do carvão foi bem sucedida usando as de FTIR e análise elementar.

Determinou-se a química superficial dos carvões activados por análise elementar e  $\text{pH}_{\text{pzc}}$ , pois este é um dos factores mais importantes que influencia a capacidade de adsorção do processo. Confirmou-se que o carvão ácido e o básico são o CA-1 e o CA-2, respectivamente.

Após a caracterização físico-química dos carvões activados estudou-se a sua aplicação no processo de adsorção. Verificou-se que o CA-1M apresenta melhor capacidade de adsorção/dessorção tanto para os compostos estudados como para a amostra.

O tempo de equilíbrio é de 90 minutos para todos os compostos estudados, sendo que o ácido gálico não chega a atingir equilíbrio no CA-2, pois este é completamente adsorvido ao fim de 15 min. O modelo cinético de pseudo-segunda ordem foi o mais adequado em representar os dados da cinética de adsorção tanto para os compostos isolados como para a mistura.

Para os compostos isolados, os resultados experimentais do estudo termodinâmico variou muito, dependendo do composto e do adsorvente utilizado. O modelo de Langmuir obteve melhor ajuste para os dados experimentais nos seguintes compostos (e respectivos carvões activados): AG (CA-2), AP (CA-1 e CA-1M), AS (CA-1 e CA-1M) e AV (CA-1 e CA-2). Nos restantes casos o modelo que se melhor ajusta aos dados experimentais é o modelo de Freundlich.

Para a mistura dos compostos, modelo de Langmuir permitiu um melhor ajuste para os dados experimentais dos seguintes CA (nos respectivos compostos): CA-2 (AP e AS) e CA-1M (AG).

Pode-se concluir, que o AV é o composto com maior afinidade com os três carvões activados estudados e na mistura de soluções, os compostos apresentam maior afinidade para o carvão activado o CA-1.

Como a constante de Freundlich está relacionada com a capacidade de adsorção e dessorção do adsorvato pelo adsorvente pode-se concluir que o carvão activado que apresenta melhor capacidade de adsorção/dessorção será o que apresentar valor de  $1/n$  muito elevado. Para os compostos isolados e a mistura é o carvão CA-1M.

O AV é o único composto que apresenta uma boa interacção na presença dos outros compostos.

Em suma, os carvões activados mostraram serem bons adsorventes de compostos fenólicos. Mas o carvão activado com melhores resultados neste trabalho é carvão Norit modificado com etilenodiamina (CA-1M).

## 4.2. TRABALHO FUTURO

Sugestão para trabalho futuro para dar continuidade e melhorar o estudo aqui apresentado:

1. Trabalhar com as lamas que ficam retidas no filtro;
2. Identificar os antioxidantes em maior concentração nas águas de cozedura em estudo;
3. Melhorar a selectividade do carvão activado com outros agentes modificadores;
4. Fazer o estudo do pH e da quantidade de carvão activado;
5. Isolar os compostos extraídos da amostra;
6. Estudar compostos diferentes, uma vez que neste trabalho se utilizaram antioxidantes com estruturas muito similares;
7. Estudo de viabilidade das técnicas de extracção.



## **5. BIBLIOGRAFIA**



- [1]. AEP, 2000. Manual de Boas Práticas ambientais e energéticas – Indústria da cortiça. Associação Empresarial de Portugal, Lisboa, Portugal.
- [2]. PNAC, 2006. Resíduos. Programa nacional para as alterações climáticas, Portugal.
- [3]. Plano Nacional de Prevenção dos Resíduos Industriais (PNPRI), 2001. Sector da Indústria da Cortiça.
- [4]. Santana, C. M., Ferrera, Z. S., Padrón, E. T., Rodríguez, J. J. S., 2009. Methodologies for the Extraction of phenolics compounds from environmental samples: New approaches. *Molecules*, 14, p. 298 – 320.
- [5]. Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., Parajo, J.C., 2011. Recovery, concentrations and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105, p. 1 – 27.
- [6]. APCOR, <http://www.apcor.pt/>. Data de pesquisa: 1 de Agosto de 2012.
- [7]. Silva, S. P., Sabino, M.A., Fernandes, E.M., Correló, V. M., Boesel, L. F., Reis, R. L., 2005. Cork: Properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50, p. 345 – 365.
- [8]. Gil, L., 2006. A cortiça como material de construção: Manual Técnico. APCOR, Portugal.
- [9]. INPI, 2005. A utilização e a valorização da propriedade industrial no sector da cortiça. Instituto nacional da propriedade industrial, Lisboa, Portugal.
- [10]. FABRICOR, <http://www.fabricor.pt/>. Data de pesquisa: 2 de Agosto de 2012.
- [11]. Minhalma, M., Pinho, M. N., 2001. Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 22–23, p. 479 – 488.
- [12]. McCabe, H., *Unit Operations of Chemical Engineering*. McGraw-Hill.
- [13]. Homem, A., 2009. Carvão activado a partir da cortiça: avaliação das potencialidades para tratamento e análise de águas contaminadas. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- [14]. Robert, H. P., 2008. *Perry's Chemical Engineers Handbook*, 8<sup>th</sup> Edition. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- [15]. Haghseresht, F., Nouri, S., Finnerty, J. J., Lu, G. Q., 2002. Effects of surfaces chemistry on aromatic compound adsorption from dilute aqueous solutions by activated carbon. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, p. 10935 – 10943.

- [16]. Figaro, S., Louisy-Louis, S., Lambert, J., Ehrhardt, J. J., Quensanga, A., Gaspard, S., 2006. Adsorption studies of recalcitrant compounds of molasses spentwash on activated carbons. *Water Research*, 40, p.3456 – 3466.
- [17]. Zhang, S., Shao, T., Karanfil, T., Pan, B., 2012. The correlation between structural characteristics of activated carbons and their adsorption of organic solutes from aqueous solutions. *Adsorption*. DOI: 10.1007/s10450-012-9396-0.
- [18]. Ramos, P. H., Guerreiro, M. C., Resende, E. C., Gonçalves, M., 2009. Produção e caracterização de carvão ativado produzido a partir do defeito preto, verde, ardido (PVA) do café. *Química Nova*, 32, p. 1139 – 1143.
- [19]. Poghosian, A. A., 1997. Determination of the  $pH_{pzc}$  of insulators surface from capacitance – voltage characteristics of MIS and EIS structures. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44, p. 551 – 553.
- [20]. Özkayz, B., 2006. Adsorption and desorption of phenol on activated carbon and a comparison of isotherm models. *Journal of Hazardous Materials*, B129, p. 158 – 163.
- [21]. HO, Y. S., 2006. Review of second-order models for adsorption systems. *Journal of Hazardous Materials*, 136, p. 681 – 689.
- [22]. DO, D. D., 1998. Series on Chemical Engineering (Vol.2). *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*. Imperial College Press, Londres.
- [23]. HO, Y. S., 2004. Citation review of Lagergren Kinetic rate equations on adsorption reactions. *Scientometrics*, 59, p. 171 – 177.
- [24]. Bertolini, T. C. R., Fungaro, D. A., 2011. Estudos de equilíbrio e modelagem cinética da adsorção do corante cristal Violeta sobre zeólitas de cinzas leve e pesada de carvão. *Cleaner production initiatives and Challenges for a sustainable World*, São Paulo, Brasil.
- [25]. Roostei, N., Tezel, F. H., 2003. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption. *Journal of Environmental Management*, 70, p. 157 – 164.
- [26]. Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40, p. 1361 – 1402.
- [27]. Subramanyam, B., Das, A., 2009. Linearized and non-linearized isotherm models comparative study on adsorption of aqueous phenol solution in soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6, p. 633 – 640.

- [28]. Mohan, D., Chander, S., 2001. Single component and multi-component adsorption of metal ions by activated carbons. *Colloids and Surfaces A*, 177, p. 183 – 196.
- [29]. Neves, J. M., Matos, C. M., Moutinho, C. G., Gomes, L. R., Teixeira, T., 2009. Actividade antioxidante e avaliação *in Vitro* da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *mentha x piperita*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 6, p. 344 – 354.
- [30]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free Radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, p. 25 – 30.
- [31]. Nawar, W. W., 1985. Lipids in: Fennema. *Food Chemistry*, 2<sup>ed</sup>, p. 139 – 244.
- [32]. Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, p. 67 – 103.
- [33]. Degáspari, C. H., Waszczynskyj, N., 2004. Antioxidants properties of phenolics compounds. *Visão Académica Curitiba*, 5, p. 33 – 40.
- [34]. Birch, A. E., Fenner, G. P., Watkins, R., Boyd, L. C., 2001. Antioxidants properties of evening primrose seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, p. 4502 – 4507.
- [35]. Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A. A., 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, p. 4083 – 4089.
- [36]. King, A., Young, G., 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99, p. 213 – 218.
- [37]. Soares, S. E., 2002. Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*, Campinas, 15, p. 71 – 81.
- [38]. Dossiê Antioxidantes, 2009. *Food Ingredients*, Brasil, 6, p. 16 – 30.
- [39]. Würtzen, G., 1990. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of Food chemicals: antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 28, p. 743 – 745.
- [40]. Antunes, A. J., Canhos, V., 1984. *Aditivos em alimentos*. Editora da Unicamp.
- [41]. Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de Novembro de 1988.
- [42]. Hallicuel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O. I., 1995. The characterization of Antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, p. 601 – 617.

- [43]. SIX C USA Co., LTD. Contacto: japan@globals-globals.com.
- [44]. Roostei, N., Tezel, F. H., 2006. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption. *Journal of Environmental Management*, 70, p. 157 – 164.
- [45]. Lillo-Rodenas, M. A., Fletcher, A. J., Thomas, K. M., Cazorla-Amorós, D., Linares-Solano, A., 2006. Competitive adsorption of a benzene-toluene mixture on activated carbons at low concentration. *Carbon*, 44, p. 1455 – 1463.
- [46]. Dursun, A. Y., Kalayci, Ç. S., 2005. Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic studies on the adsorption of phenol *onto chitin*. *Journal of Hazardous Materials*, 123, p. 151 – 157.
- [47]. Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> Ed, 1999. American Public Health Association (APHA); American Water Works Association (AWWA); Water Pollution Control Federation (WPCF), Washington DC.
- [48]. Protocolo para utilização do Thermoreactor TR300. Instituto Tecnológico Nuclear, 2003.
- [49]. Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M., 2004. Determination of total organic carbon – an overview of current methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, p. 716 – 726.
- [50]. Waterhouse, A. L., 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- [51]. Guedes, V. H., Perin, L., Reis, V. M., Baldani, J. I., Teixeira, K. R., 2007. Quantificação de proteínas totais de bactérias diazotróficas crescidas em meio de cultivo semi-sólido. *Comunicado Técnico (CNPAB)*, 95, p. 1 – 4.
- [52]. Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996. The Ferric Reducing Ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”, The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, p. 70 – 76.
- [53]. Sodeman, D.A., Lillard, S.J., 2001. Who Set the Fire? Determination of Arson Accelerants by GC–MS in an Instrumental Methods Course. *Journal of Chemical Education*, 78, p. 1228 – 1230.
- [54]. Knapp, D. R., 1979. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley and Sons, Nova Iorque.
- [55]. Zhu, T., Row, K. H., 2011. Preparation of amino-modified active carbon cartridges and their use in the extraction of quercetin from *Oldenlandia diffusa*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, p. 713-720.

- [56]. Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., Minhalma, M., 2011. Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorization study. *Water Research*, 45, p. 904 – 912.
- [57]. Madureira, J. F., 2011. Estudo do efeito da radiação ionizante na capacidade antioxidante dos compostos presentes na água de processo da indústria corticeira. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [58]. Adedapo, A. A., Jinoh, F. O., Afolayan, A. J., Masika, P. J., 2009. Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Cettis Africana*. *Records of Natural products*, 3:1, p. 23 – 31.
- [59]. Minhalma, M., Pinho, M. N., 2001. Flocculation/ Flotation/ Ultrafiltration integrated process for the treatment of cork processing wastewaters. *Environmental Science and Technology*, 35, p. 4916 – 4921.
- [60]. Srivastava, V. C., Swamy, M. M., Mali, I. D., Prasad, B., Misha, I. M., 2006. Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbon: Equilibrium, Kinetics and thermodynamics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 272, p. 89 – 104.





## **6. ANEXO**



## 6.1. ANEXO A – Protocolo experimental de determinação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

### 1. Reagentes:

- Amostra (água de cozedura de cortiça);
- Ácido gálico padrão para calibração (PM: 170,12 g/mol);
- Reagente Folin-Ciocalteu (FC);
- Solução de carbonato de sódio.

### ❖ Preparação das soluções:

- **Solução - Padrão de calibração de ácido gálico**
  - Material:
    - Balão volumétrico de 100 mL e 50 mL;
    - Vidro de relógio;
  - Procedimento:
    - Dissolver 0,5 g de ácido gálico em 10 mL de etanol e diluir para 100 mL com água (5g/L final);
    - Diluir a solução de ácido gálico para criar padrões com concentrações de 50, 100, 250 e 500 mg/L para um balão de 50 mL.

Volume de Ácido Gálico (mL)	Volume de Água (mL)	Concentração de Ácido Gálico (mg/L)
0,5	49,5	50
1	49	100
2,5	47,5	250
3,5	46,5	350
5	45	500

**Nota:** Armazenar até 2 semanas a 4°C.

- **Solução de carbonato de sódio (200 g/L)**

- Material:

- Balão volumétrico de 500 mL;
- Vidro de relógio;

- Procedimento:

- Dissolver 100 g carbonato de sódio anidro em 400 mL de água e levar à ebulição.
- Depois de arrefecer, adicionar alguns cristais de carbonato de sódio e deixar repousar durante 24 horas à temperatura ambiente.
- Filtrar e perfazer os 500 mL com água destilada.

**Nota:** Armazenar indefinidamente à temperatura ambiente.

## **2. Procedimento Experimental:**

- i. Colocar 1ml da amostra, ou solução-padrão de calibração de ácido gálico, ou branco (água destilada ou desionizada) em um balão volumétrico de 100ml.

*(Repetir este passo três vezes para a amostra e a solução padrão.)*

- ii. Adicionar aproximadamente 70ml de água, seguido de 5 ml de reagente FC. Agitar para misturar e incubar durante 5 min à temperatura ambiente.

*(A incubação não deve de passar 8 min)*

- iii. Adicionar 15 ml de solução de carbonato de sódio.

- iv. Adicionar água aos 100 ml da linha, misturar e incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.

- v. Transferir 1,5 ml para 1 cm, 2 ml de plástico ou célula de vidro e medir a sua absorvância a 765nm no espectrofotómetro.

*(Repetir este passo três vezes para cada replica.)*

- vi. Subtrair a absorvância do branco de todas as leituras e criar uma recta de calibração a partir das soluções padrão.

- vii. Usar esta curva para determinar a concentração de ácido gálico correspondente as amostras.

## 6.2. ANEXO B – Protocolo experimental da Determinação da actividade antioxidante total pelo Método radical livre DPPH

### ❖ Reagentes

- Metanol P.A.;
- Água destilada (Milli-Q);
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,3 g/mol);

### ❖ Preparação das soluções

#### • Solução de DPPH 0,06 mM

- Material:
  - Balão volumétrico de 100 mL
  - Vidro de relógio
  - Proveta de 100 mL
  - Pipeta de 25 mL
- Procedimento:
  1. Dissolver 0,0024 g de DPPH em 20 mL de metanol.
  2. Trabalhar ao escuro.
  3. Perfazer o volume com metanol e homogeneizar.
  4. Proteger todo o balão volumétrico com papel de alumínio.

**Nota:** Esta solução é estável, pelo menos, durante uma semana se for conservada a 4°C.

### ❖ Procedimento Experimental

#### 1. Elaboração da Recta de calibração

- a. Diluir a solução de DPPH (0,06 mM) inicial, nas concentrações apresentadas na tabela abaixo, em balões volumétricos de 10 mL;

Volume de DPPH (mL)	Volume de metanol (mL)	[DPPH] final (mM)
0	10	0
1,7	8,3	0,01
3,3	6,7	0,02
5	5	0,03
6,7	3,3	0,04
8,3	1,7	0,05
10	0	0,06

- b. Pipetar 4 mL da solução padrão para uma célula;

*(Repetir este passo três vezes para a solução padrão.)*

- c. Ler no espectrofotômetro a 515 nm contra branco (metanol).

**Nota:** Este procedimento deve ser elaborado num ambiente escuro.

## **2. Determinação da actividade antioxidante total**

- a. Testar no início de cada dia de trabalho a solução de DPPH.<sup>2</sup>
- b. Preparar as diluições necessárias das amostras em estudo;
- c. Pipetar 0,1 mL de cada diluição da amostra e 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM) para uma célula;

*(Repetir este passo três vezes.)*

- d. Homogeneizar os tubos no vortex.
- e. Ler no espectrofotômetro a 515 nm contra branco.
- f. As leituras devem ser monitoradas a cada minuto, onde observa-se a redução da absorvância até sua estabilização.

---

<sup>2</sup> Determinar a absorvância da solução de DPPH para uma concentração de 0,06 mM, deve de dar um valor próximo ao obtido na recta de calibração.

### 6.3. ANEXO C - Protocolo experimental de Determinação do poder antioxidante pelo Método FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

#### ❖ Reagentes:

- Acetato de sódio tri-hidratado (PM = 136,08);
- Ácido acético glacial P.A.;
- Ácido clorídrico P.A. 37% (PM = 36,45; d = 1,18);
- Água destilada (Milli-Q);
- Cloreto férrico hexa-hidratado (PM = 270,3);
- Sulfato ferroso hepta-hidratado (PM = 278,02);
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (PM = 312,34).

#### ❖ Preparação das soluções

- **Tampão acetato (0,3 M, pH 3,6)**

- Material:

- Balão volumétrico de 500 mL
    - Vidro de relógio
    - Pipeta graduada de 10 mL
    - Proveta de 250 mL

- Procedimento:

- 1. Pesar 1,55 g de acetato de sódio tri-hidratado ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ );
    2. Dissolver num pequeno volume de água;
    3. Adicionar 8 mL de ácido acético glacial ( $C_2H_4O_2$ );
    4. Perfazer o volume com água e homogeneizar.
    5. Confirmar o pH da solução.

**Nota:** Armazenar a solução no frigorífico a 4°C.

- **Solução de Sulfato Ferroso (1 mM)**

- Material:

- Balão volumétrico de 100 mL
    - Vidro de relógio
    - Proveta de 100 mL

- Procedimento:

- 1. Pesar 0,0278 g de sulfato ferroso hepta-hidratado ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ );
    2. Perfazer o volume com água e homogeneizar.

**Nota:** Usar apenas no dia da análise.

- **Solução de HCl (40 mM)**

- Material:
  - Balão volumétrico de 50 mL
  - Pipeta graduada de 1 mL
- Procedimento:
  1. Colocar um pequeno volume de água no balão volumétrico e adicionar 0,167 mL de HCl concentrado;
  2. Perfazer o volume com água e homogeneizar;

**Nota:** Armazenar à temperatura ambiente por tempo indeterminado.

- **Solução de TPTZ (10 mM)**

- Material:
  - Pipeta graduada de 1 mL
  - Vidro de relógio
  - Balão Volumétrico de 5 mL
- Procedimento:
  1. Dissolver 0,0156 g de TPTZ (2,4,6-Tris[2-pyridyl]-s-triazine) em, aproximadamente 1 mL de HCl (40 mM);
  2. Perfazer o volume com HCl (40 mM) e homogeneizar.

**NOTA:** Armazenar sob refrigeração, durante um mês.

- **Solução de Cloreto Férrico (20 mM)**

- Material:
  - Proveta de 50 mL
  - Vidro de relógio
  - Balão Volumétrico 5 mL
- Procedimento:
  1. Dissolver 0,2703 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em 20 mL de água;
  3. Perfazer o volume com água e homogeneizar.

**NOTA:** Armazenar sob refrigeração até um mês.



- **Solução de FRAP**

- Material:
  - Pipetas graduadas de 25 mL e 5 mL
  - Frasco opaco de 100 mL
- Procedimento:
  1. Medir, com o auxílio da proveta, 25 mL da solução tampão acetato (0,3 M, pH 3,6);
  2. Pipetar 2,5 mL da solução de TPTZ (10 mM);
  3. Pipetar 2,5 mL da solução de cloreto férrico (20mM);
  4. Homogeneizar e colocar em banho-maria a 37°C.

**NOTA:** A solução deve ser feita a cada dia de trabalho.

❖ **Procedimento Experimental**

**1. Elaboração da Recta de calibração**

- a. Diluir a solução de sulfato ferroso (1 mM) inicial, nas concentrações apresentadas na tabela abaixo, em balões volumétricos de 10 mL;

Volume de Sulfato Ferroso (mL)	Volume de Água (mL)	[Sulfato Ferroso] <sub>final</sub> (mM)
1	9	0,1
2	8	0,2
4	6	0,4
6	4	0,6
8	2	0,8
10	0	1,0

- b. Pipetar 100 µL da solução padrão para um tubo;
- c. Adicionar 3 mL da solução de FRAP;
- d. Incubar em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos;
- e. Ler no espectrofotômetro a 593 nm contra solução branco (é preparada da mesma maneira, em vez de ter solução padrão usar água).

**2. Determinação do poder antioxidante total**

- a. Preparar as diluições necessárias das amostras em estudo;
- b. Pipetar 100 µL de amostra para um tubo;

- c. Adicionar 3 mL de solução de FRAP;
- d. Incubar em banho-maria a 37°C, durante 35 minutos;
- e. Ler no espectrofotômetro a 593 nm contra solução branco (é preparada da mesma maneira, em vez de ter solução padrão usar água).

**NOTA:** É importante confirmar o tempo de incubação para os dois procedimentos. Para isso, é necessário fazer leituras de absorvância a cada minuto, ao mesmo tempo que se vai incubando, até se atingir um patamar mais ou menos estável, ou seja com uma variação constante.

#### 6.4. Anexo D – Espectros dos Compostos estudados

Para a identificação dos compostos por cromatografia foi necessário determinar o espectro de cada composto por espectrofotometria UV/Visível.

- **Ácido Gálico**

Observando a Figura 6.1, pode-se determinar que o comprimento de onda de identificação do AG é 259,5 nm.

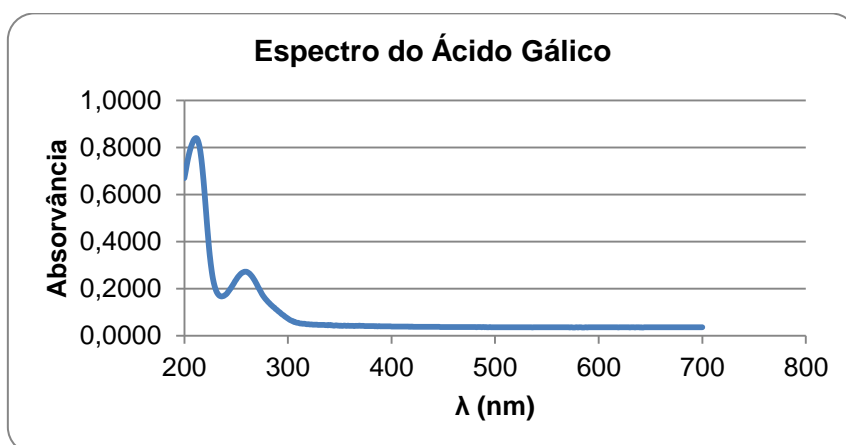


Figura 6.1: Espectro do Ácido Gálico.

- **Ácido Protocatecuico**

Observando a Figura 6.2, pode-se determinar que o ácido protocatecuico apresenta dois picos de identificação com os seguintes comprimentos de onda: 251 e 288 nm.

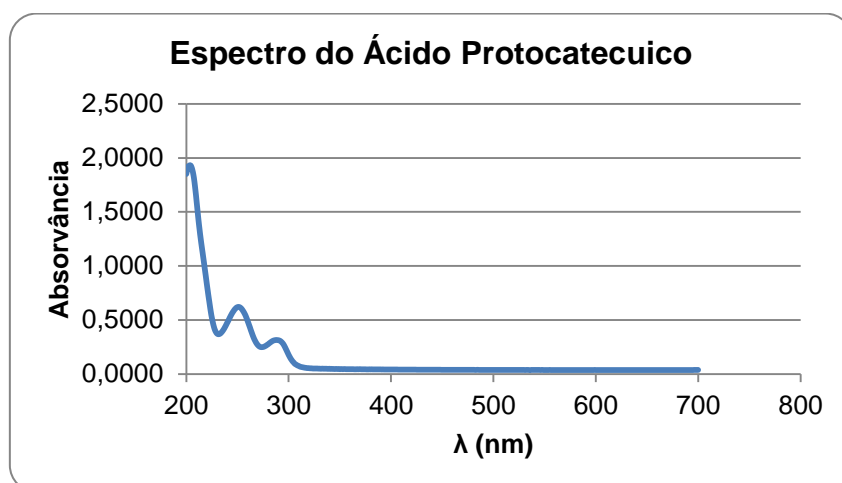
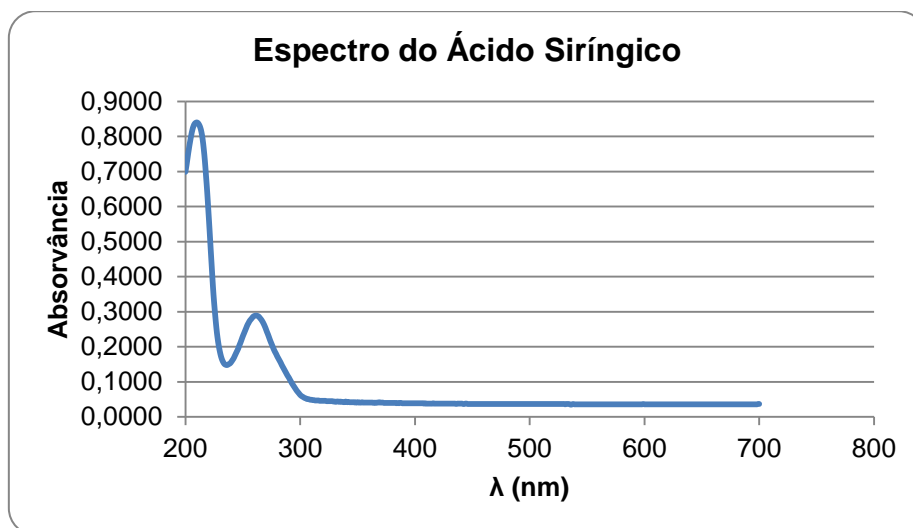


Figura 6.2: Espectro do Ácido Protocatecuico.

- **Ácido Siríngico**

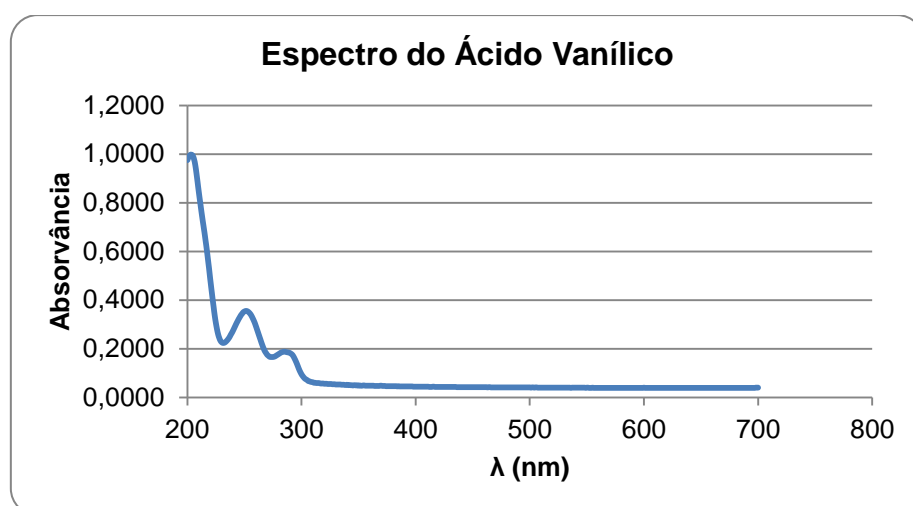
Na Figura 6.3, pode-se observar que o comprimento de onda de identificação do AS é 261,5 nm.



**Figura 6.3:** Espectro do Ácido Siríngico.

- **Ácido Vanílico**

Na Figura 6.2, pode-se observar que os picos de identificação do ácido Vanílico têm os seguintes comprimentos de onda: 251,5 e 285 nm.



**Figura 6.4:** Espectro do Ácido Vanílico.

6.5. Anexo E – Cromatogramas e espectros analisados neste estudo

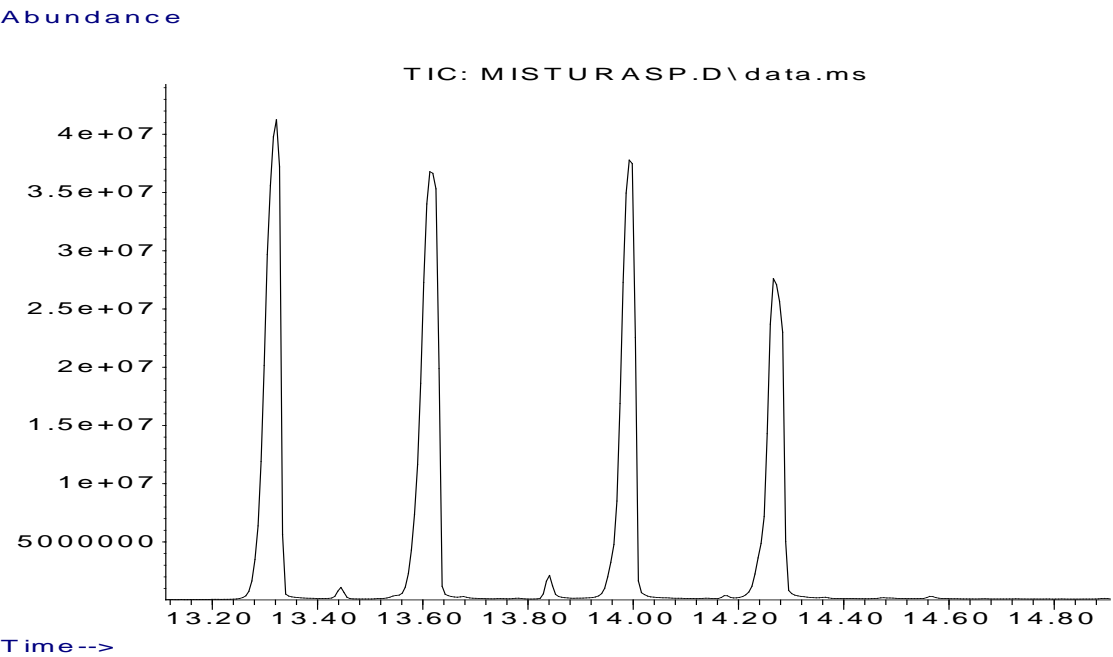


Figura 6.5: Cromatograma da mistura de soluções dos compostos padrão para os quatro compostos.

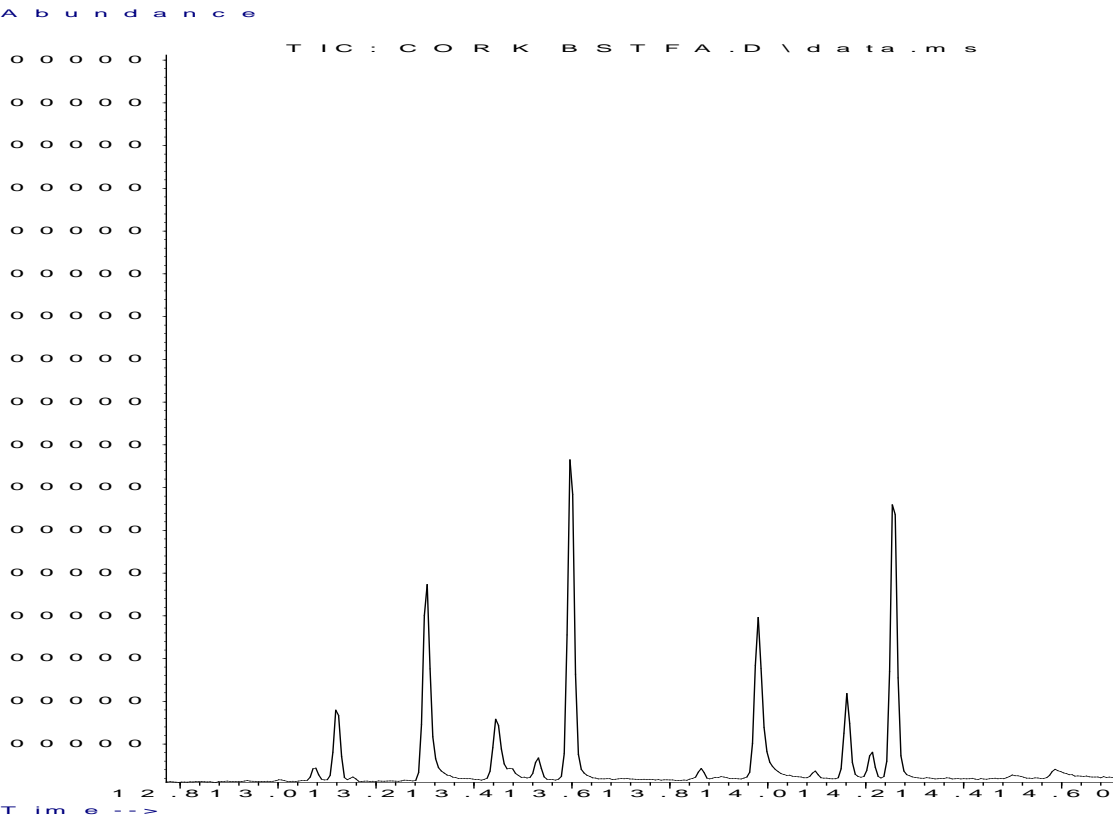


Figura 6.6: Cromatograma da amostra de água de cozedura de cortiça para a gama dos Compostos fenólicos.

Abundance

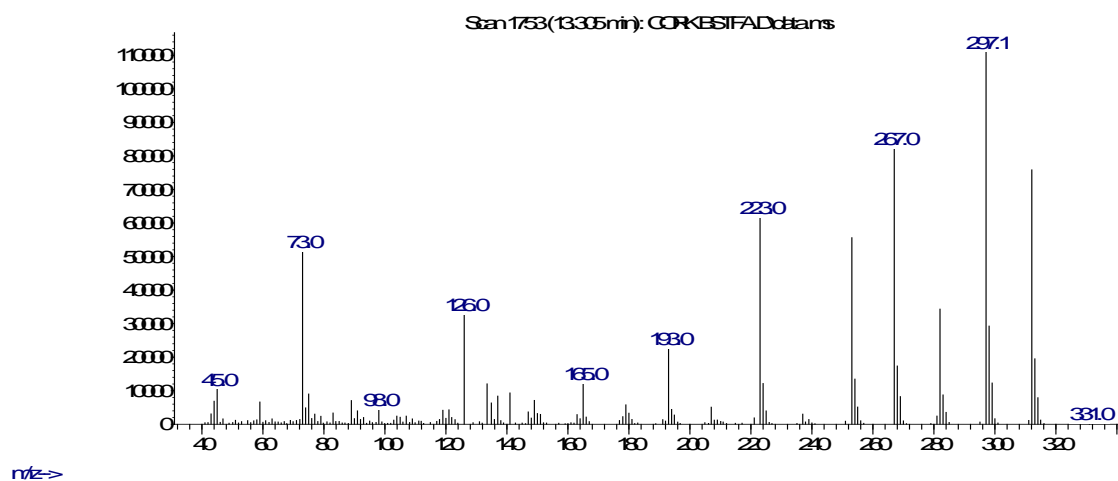


Figura 6.7: Espectro do AV da amostra de água de cozedura.

Abundance

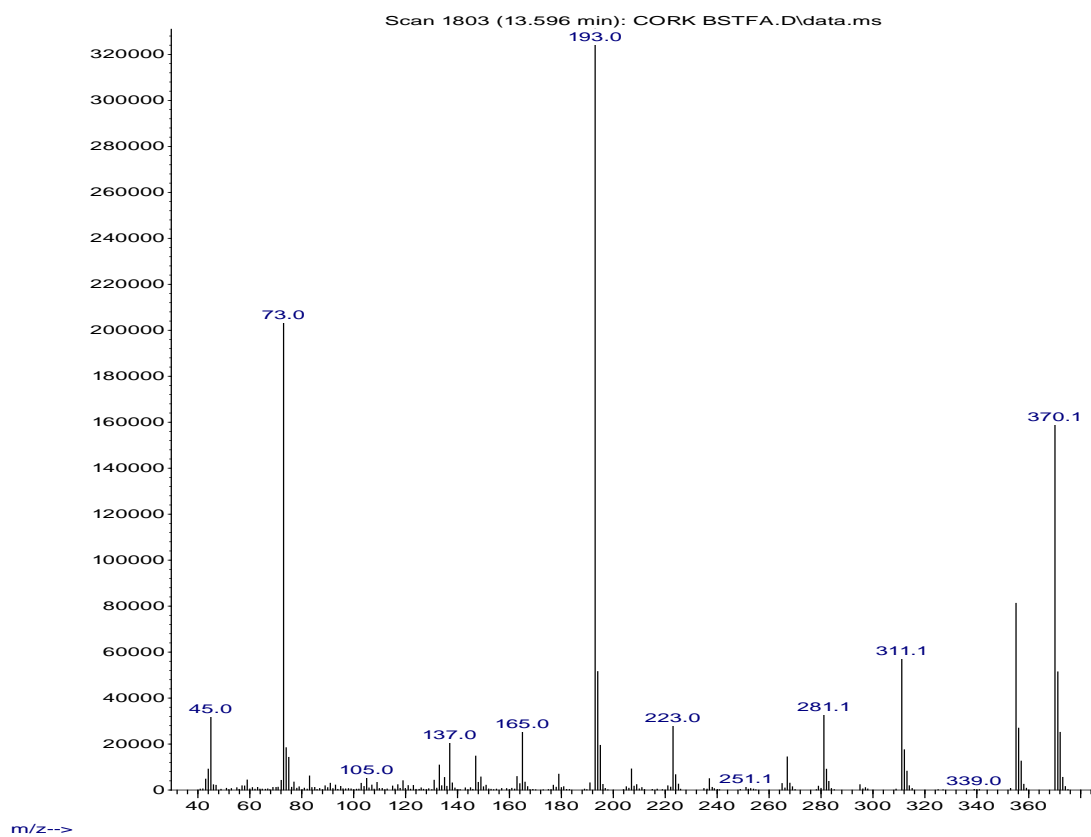


Figura 6.8: Espectro do AP da amostra de água de cozedura.

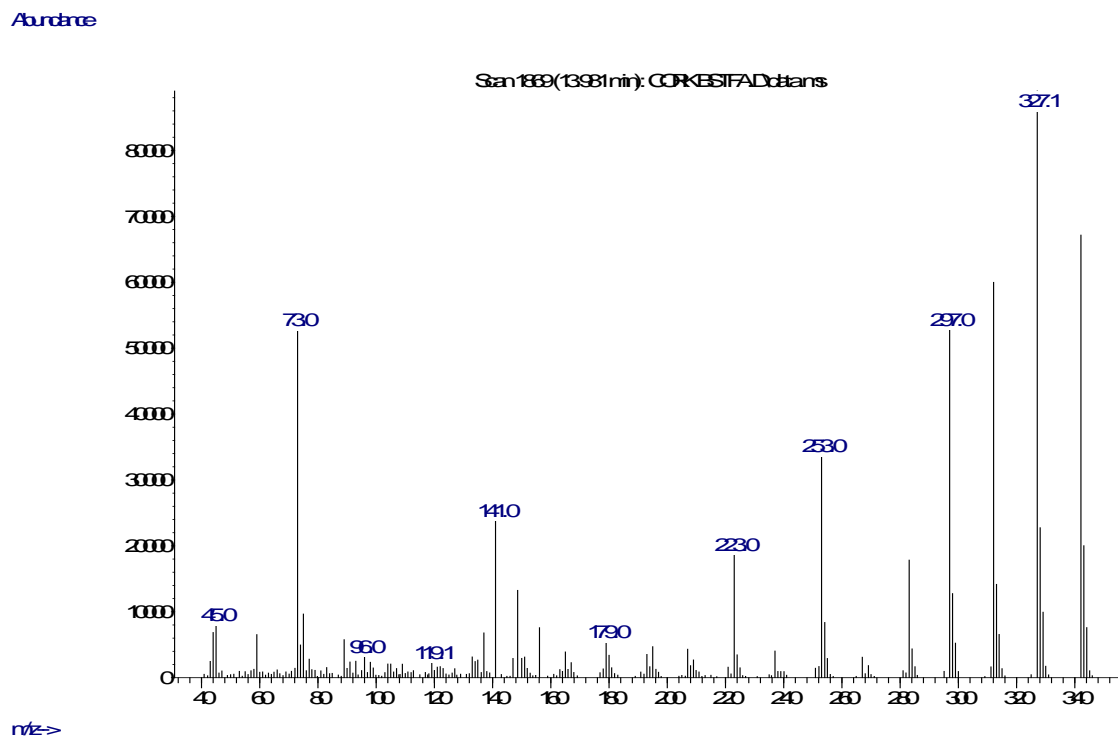


Figura 6.9: Espectro do AS da amostra de água de cozedura.

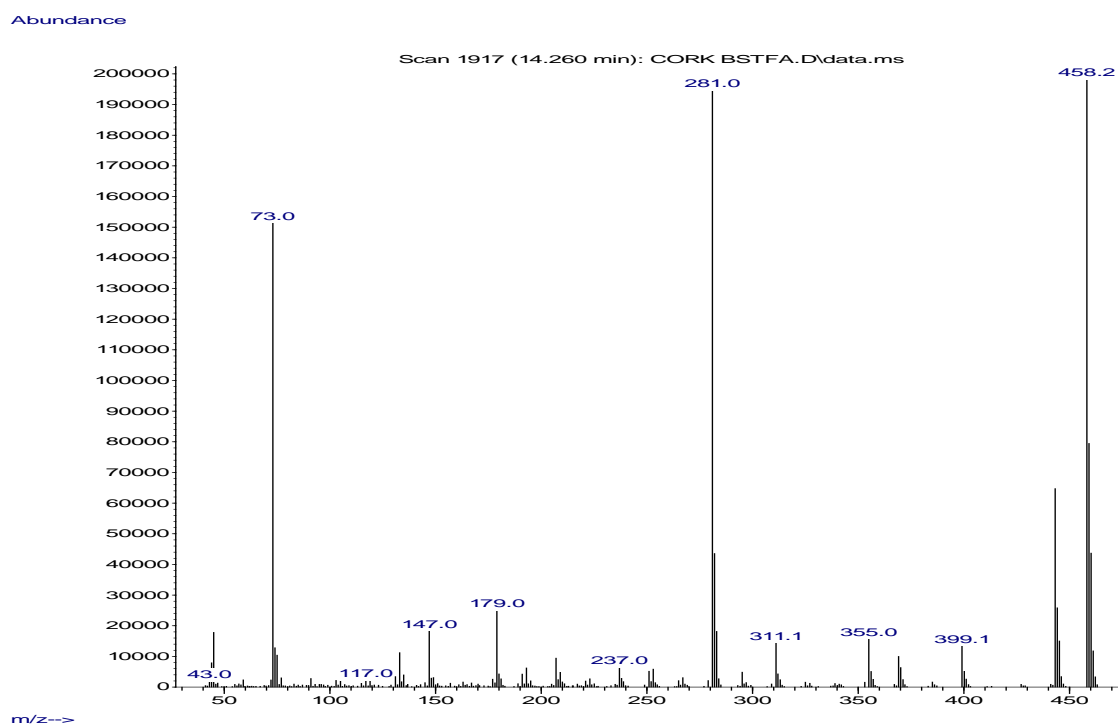


Figura 6.10: Espectro do AG da amostra de água de cozedura.